

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE : VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir
de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*.
Caractérisations des produits et optimisation du procédé

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Génie des procédés

Spécialité : Biochimie et biotechnologie des produits marins

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Karine LE ROUX

Le 4 mai 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs M. DESBRIERES Jacques, *Professeur* – Université de Pau et des Pays de l'Adour
M. TRYSTRAM Gilles, *Professeur* – AgroParisTech
Examineurs M. HUBERT Antoine, *Directeur de la Recherche et de l'Innovation* - YNSECT
M. LEGRAND Jack, *Professeur* – Université de Nantes
M. ABDELLAH Arhaliass, *Professeur* – Université de Nantes
M. BERGE Jean-Pascal, *Cadre de recherche* – IFREMER, Nantes
M. BARON Régis (invité), *Cadre de recherche* – IFREMER, Nantes

Directeurs de thèse : Jean-Pascal Bergé & Abdellah Arhaliass

Se que signifie le mot recherche ? Vivre pleinement la question

Edgar Morin (1921-)

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes plus chaleureux remerciements à Jacques Desbrières, Gilles Trystram, Antoine Hubert et Jack Legrand, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

En premier lieu, je remercie et félicite les initiateurs de ce sujet de thèse, pour lequel je garde un grand intérêt au-delà de la démarche « formation » et pour lequel comme tout doctorant, je me suis investie « corps et âme » ! Je remercie vivement Régis Baron pour son encadrement, ses critiques constructives, son regard méthodique et surtout sa patience pour me rendre plus rigoureuse. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Abdellah Arhaliass pour sa confiance au cours de cette étude, ses encouragements et les opportunités de présenter ce travail de thèse lors de conférences et séminaires. Je tiens également à remercier vivement Jean-Pascal Bergé pour avoir accepté d'encadrer cette thèse, pour m'avoir guidée techniquement et m'avoir fait partager ses connaissances, ainsi que d'avoir su maintenir le cap de l'étude lorsque des voies divergentes étaient possibles. J'ai également bénéficié de l'aide et du soutien d'Eric Leroy, avec qui les échanges ont toujours aboutis à un bond en avant.

Merci à Patrick Durand pour les informations qu'il a pu m'apporter au démarrage de la thèse. Il faut bien avouer que la chitine n'était plus beaucoup étudiée à l'IFREMER et par conséquent, la fusion des connaissances de chacun a été très précieuse. En premier lieu, Alain Domard m'a transmis l'essentiel des points à conserver en mémoire lorsqu'on étudie ce polymère, je lui en suis très reconnaissante. Ainsi qu'à Dominique Gillet et Jean-Pierre Say, des sociétés Mahtani et France Chitine, qui m'ont apporté des notions précieuses liées aux applications de la chitine et ses dérivés, et donc aux exigences concrètes du marché. J'ai toujours souhaité rechercher en lien direct avec la réalité des ressources disponibles et des demandes du marché. Stéphane Trombotto est sans aucun doute la personne qui m'a le plus enseigné sur les caractéristiques de la chitine et sur ces méthodes d'analyse. De plus je lui suis reconnaissante d'avoir pris part à l'étude, via des résultats de RMN, et j'ai beaucoup apprécié nos échanges.

Parmi les résultats présentés dans ce manuscrit, une partie non négligeable n'aurait pu être obtenue sans l'équipe du MC2 de l'INRA de Nantes. Je tiens donc à exprimer mes plus vifs remerciements à Denis Lourdin, Marion de Carvellho, Alain Buléon, Bruno Pontoire et Arnaud Turbin. Certains résultats proviennent d'une autre unité de l'INRA, merci à Corinne Rondeau pour les analyses de RMN en ^{13}C .

Pour leur aide technique et scientifique, merci également à Michaël Paris de l'IMN, Virginie Sylvestre du CEISAM, ainsi que Marie-Madeleine Giraud-Guille de l'Université de Pierre & Marie Curie, Emmanuel Belammie de Montpellier, le Dr Varüm de Biopolymer, Yves Grohens de LIMAB et George Choubert, spécialiste en astaxanthine. Je remercie vivement l'ancienne équipe de S3D pour leur accueil et les échanges humains.

Merci à Guillaume Roelens pour son aide précieuse en ATG et MEB. Merci à mes complices du GEPEA : Benjamin, PEF, Hélène & son mari, le voisin, Luc, Anthony, Julie, François, Anne, JB, Abdul, Seb, Farid, et j'en oublie des doctorants et des stagiaires ! Un grand merci

également à Sandrine, Carole & Arnaud. Il est une personne que j'aurais tant aimé remercier de son vivant, Maryse, technicienne irremplaçable du GEPEA, l'incarnation de la bonne humeur, de la volonté et de l'efficacité, une profondément belle personne qui s'en est allée trop vite, trop tôt et sans crier garde. Merci pour cette leçon qui est tombée à un moment crucial.

Un énorme remerciement général à mes collègues du bâtiment T du centre IFREMER de Nantes. Plus précisément, je tiens à remercier Isabelle pour sa gestion parfaite, Sylvie pour son attention, sa confiance et ses connaissances en bibliographie, Françoise pour son énergie, Fred pour son calme et sa bonne humeur, Sandrine pour sa complicité et son efficacité exemplaire, Claire pour son volontarisme et ses compétences, JP pour son humour, Camille pour sa culture générale des produits marins et des pays, Monique, Laetitia & Aurélie pour leur attention et les transmissions d'informations précieuses, les Christine pour différentes raisons (humaines et techniques), Sylvia, Corinne et Jacqueline pour leur aide, leurs connaissances en sucres et leur sympathie...Jojo, triple-J, Marc & Véronique, Mireille, Anne & Anne... vous avez tous apporté une pierre agréable à mon environnement de travail, tant pour la bonne humeur que pour les idées en R&D. Je suis également reconnaissante à Claire Boisset, Christophe Bailly, Nadia Nour et Aurélie Lecolier pour nos différents échanges. Merci également à Vincent Lorcy, pour sa participation active aux résultats au cours de son stage.

La thèse est une succession d'aventures dans l'aventure, de grandes victoires autant que de déceptions et de frustrations, qu'il est difficile d'expliquer aux non-pratiquants, c'est pourquoi je tiens à remercier très spécialement mes soupapes de sécurité, amis et compères : Papa, Raoul, Emna, Zo et surtout Christelle, Anaïs, Sabrina, Gaëtan, Vincent... & Élodie, même si elle n'est pas doctorante ! Pour nos partages de « coup-de-gueule » et « coup-de-cœur » merci à Benoît, Myriam, Thierry, Marie, David, Aurélien, Dung, Cédric et j'en oublie !

Un grand bravo à mon entourage qui n'a pas eu d'autre choix que me supporter pendant ces trois années ! En particulier Alex, Marielle, mes parents et le reste de ma famille, ainsi que Tatiana, Katia, Stef, Rachou, Delphine, Sophie, Emilie, Julie, Aurélie, la Dream Team de la Défense et celle de Guiss Beach ! Enfin, je m'excuse auprès de tous ceux pour qui je suis devenue un fantôme ces dernières années... c'était pour cet ouvrage que je vous dédis !

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
ABREVIATIONS	xvi

Introduction	1
Chapitre 1 – Etude bibliographique	9
I. Contexte économique.....	11
I.1. Évolution du marché des produits marins, focus sur les crustacés	11
I.2. Valorisation des coproduits marins : la chitine et ses dérivés	14
I.3. Disponibilité de la chitine, ressource naturelle	16
II. Les domaines d’applications de la chitine et de ses dérivés	17
II.1. Les applications dans le domaine agricole.....	18
II.2. Les applications dans le domaine du traitement de l’eau.....	18
II.3. Les films de chitine/ chitosan.....	18
II.4. Les applications dans les industries alimentaires et diététiques	19
II.5. Les applications dans le domaine médical	20
II.6. Autres applications.....	22
II.7. Évolution des volumes de ventes par domaine d’application	22
II.8. Conclusions sur les caractéristiques de la chitine et ses applications	23
III. Structure de la matrice chitineuse chez les crustacés	23
III.1. La biosynthèse de la chitine.....	23
III.2. L’organisation de la cuticule des crustacés	24
IV. Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques de la chitine et ses dérivés.	28
IV.1. La structure cristalline et l’indice de cristallinité	29
IV.2. Le degré de polymérisation	31
IV.3. La masse molaire et la polydispersité des longueurs de chaîne	31
IV.4. La solubilité	32
IV.5. Le degré d’acétylation et la répartition des groupes acétylés.....	34
V. La production de chitine et de ses dérivés par voie chimique.....	35
V.1. Schéma général	35
V.2. La déminéralisation.....	36
V.3. La déprotéinisation	37
V.4. L’étape de blanchiment.....	39
V.5. La désacétylation et la dépolymérisation.....	39
VI. Les traitements biologiques	41
VI.1. La voie fermentaire.....	41
VI.2. Déprotéinisation et de déminéralisation enzymatiques	43
VI.3. Désacétylation et dépolymérisation enzymatique	46
VI.3.1. La désacétylation enzymatique.....	46
VI.3.2. La dépolymérisation enzymatique ou la chitinolyse	47
VII. Les enjeux de la valorisation des produits marins	48
VII.1. Valeur ajoutée des coproduits marins	48
VII.1.1. Les composés protéiques.....	49
VII.1.2. Les composés lipidiques	50
VII.1.3. Les minéraux	52
VII.2. L’hydrolyse enzymatique des coproduits marins.....	53
VII.3. Les objectifs envisagés par cette étude	53

Chapitre 2 – Choix des méthodes & application aux produits de référence	55
I. Méthodes d'analyse de la composition des produits.....	57
I.1. Identification et préparation de la matière première	57
I.2. Matière sèche.....	57
I.3. Teneur en cendres.....	58
I.4. Teneur en lipides	58
I.5. Teneur en protéines	59
I.5.1. Dosage de l'azote par Kjeldahl (Crooke et Simpson, 1971).....	59
I.5.2. Méthodes de dosages colorimétriques des protéines.....	60
I.5.3. Dosage des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse.....	61
I.6. Teneur en résidus glycosidiques simples	62
I.6.1. Dosage colorimétrique de Dubois et al. (1956).....	62
I.6.2. Méthode de dosage colorimétrique des osamines	62
I.6.3. Dosage des résidus glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse....	63
I.7. Teneur en chitines	64
II. Méthode d'extraction de la chitine	64
II.1. L'extraction chimique.....	64
II.2. L'extraction enzymatique par protéolyse acide.....	65
III. Caractérisation qualitative des produits	66
III.1. Mesure du degré d'acétylation.....	66
III.1.1. Résonance magnétique nucléaire du liquide ^1H	66
III.1.2. Résonance magnétique nucléaire du solide en ^{13}C et ^{15}N	67
III.1.3. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier - FTIR.....	67
III.2. Mesure du degré de polymérisation.....	68
III.3. Mesure de l'indice de cristallinité.....	69
III.4. Caractérisation des propriétés thermiques	70
III.4.1. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	70
III.5. L'analyse élémentaire	71
III.6. Colorimétrie	71
IV. Application, comparaison et sélection des méthodes.....	71
IV.1. Composition de la matière première.....	72
IV.1.1. Quantification des protéines	72
IV.1.2. Caractérisation complète de la composition de la matière première	74
IV.2. Composition des produits commerciaux	75
IV.3. Composition des produits de l'extraction enzymatique	76
IV.3.1. Les résidus insolubles de la cinétique de référence.....	76
IV.4. Estimation du degré de pureté	77
IV.4.1. Recoupement par l'analyse élémentaire.....	77
IV.4.2. Recoupement par l'analyse thermogravimétrique.....	82
IV.4.3. Recoupement par RMN et FT-IR	87
IV.5. Estimation du degré d'acétylation	89
IV.6. Estimation de l'indice de cristallinité	91
V. Conclusion sur le choix des méthodes	92
Chapitre 3 – L'hydrolyse enzymatique en une seule étape par protéolyse acide.....	95
I. Introduction.....	97
II. Le milieu réactionnel acide.....	97
II.1. Choix de l'acide : l'acide phosphorique	97
II.2. Effet de l'acide sur la déprotéinisation et de la déminéralisation	97
III. La protéase acide.....	99

III.1. Choix de la protéase : la pepsine	99
III.1.1. Activité protéolytique	100
III.1.2. Activité chitinolytique	102
III.2. Les conditions d'hydrolyse par la pepsine pour extraire la chitine	102
III.2.1. Les paramètres du procédé à étudier	103
III.2.2. Mise en place d'un plan d'expérience	103
IV. Optimisation de l'extraction de la chitine par hydrolyse enzymatique.....	106
IV.1. Résultats du plan d'expérience	106
IV.2. Résultats de l'analyse statistique	112
IV.2.1. Degré de déminéralisation	112
IV.2.2. Le degré de déprotéinisation	113
IV.2.3. Estimation du degré de pureté	114
IV.2.4. Récapitulatif des analyses statistiques.....	115
IV.3. Élargissement du domaine d'étude pour la déprotéinisation.....	117
IV.3.1. Augmentation de la concentration en pepsine.....	117
IV.3.2. Augmentation de la durée d'hydrolyse.....	119
V. Modélisation.....	120
V.1. Introduction.....	120
V.2. Modélisation de la déminéralisation	122
V.3. Modélisation de la déprotéinisation	125
VI. Choix des conditions optimales	129
VII. Composition de la phase liquide et balance massique.....	130
VII.1. Bilan massique global des minéraux	130
VII.2. Bilan massique global des protéines	132
VII.3. Bilan massique global des autres composés.....	133
VIII. Extension à une autre enzyme et un autre acide.....	134
IX. Conclusions du chapitre 3	139

Chapitre 4 – Comparaison entre l'hydrolyse enzymatique acide et les autres voies d'extraction	143
I. Performances de déminéralisation et de déprotéinisation.....	145
I.1. Comparaison avec l'extraction chimique	145
I.1.1. Degré de déminéralisation.....	146
I.1.2. Degré de déprotéinisation.....	147
I.2. Comparaison avec d'autres procédés d'extraction biologique.....	148
II. Qualité physico-chimique des produits	150
II.1. Degré d'acétylation	150
II.2. Degré de polymérisation	152
II.3. Degré de cristallinité	153
II.4. Stabilité thermique	154
III. Comparaison des mécanismes d'extraction	155
IV. Valorisation de la phase soluble.....	157
IV.1. Analyse du poids moléculaire des peptides solubles.....	157
IV.2. Evolution de l'élimination des acides aminés dans le résidu solide.....	161
IV.3. Résidus glycosidiques	162
IV.4. Pigments	163
IV.4.1. Quantité de lipides et d'astaxanthine dans la phase soluble.....	163
IV.4.2. La couleur des résidus insolubles	165
V. Conclusions du chapitre 4	167

Conclusion & Perspectives	169
Références	175
Annexes	201

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tab.I.1 : Production de dérivés à partir de chitine et gamme de prix (Einbu, 2007a)</i>	15
<i>Tab.I.2 : Teneur en chitine par espèces (Mathur et Narang, 1990 ; Shahidi, 2002)</i>	16
<i>Tab.I.3 : Utilisations de la chitine/ chitosan en agroalimentaire (Crini et al. 2009)</i>	19
<i>Tab.I.4 : Répartition des applications du chitosan, en tonnes, en 2006 (GIA, 2010)</i>	23
<i>Tab.I.5 : Quantités de chitine et de carbonate de calcium (Kurita, 2006)</i>	24
<i>Tab.I.6 : Liste non-exhaustive des solvants de la chitine, (Shahidi, 2002 ; Kumar, 2004 ; Morris 2009)</i>	33
<i>Tab.I.7 : Sites des liaisons lysées en fonction de l'enzyme (Rao, 1998)</i>	43
<i>Tab.II.1: Caractéristiques des principaux dosages colorimétriques des protéines (Tyr=tyrosine, Cys=cystéine et Trp=tryptophane, His=histidine, Arg=arginine et Lys=lysine)</i>	60
<i>Tab.II.2 : Déplacements chimiques des protons et carbonés en RMN (Kasaai,2010)</i>	66
<i>Tab.II.3 : Pics caractéristiques en FT-IR de la chitine (Pawlak et al. 2003)</i>	67
<i>Tab.II.4 : Exemples de le relations employées pour déterminer le DA via la spectroscopie FT-IR</i>	68
<i>Tab.II.5 : Résultats de la teneur en protéines – comparaison des méthodes</i>	72
<i>Tab.II.6 : Composition en acides aminés dans la matière première – comparaison entre laboratoires</i>	73
<i>Tab.II.7 : Composition globale des exosquelettes de crevette P. vannamei</i>	74
<i>Tab.II.8 : Comparaison des compositions de la chitine commerciale (% en poids sec)</i>	75
<i>Tab.II.9 : Comparaison de plages de dégradation thermique de la chitine et des protéines selon les études</i>	83
<i>Tab.II.10 : Caractéristiques des comportements thermiques des produits de différents degrés de pureté</i>	84
<i>Tab.II.11 : Composition des produits de différents degrés de pureté (estimation par *CPG, **lavage au NaOH)</i>	85
<i>Tab.II.12 : Comparaison des DA, DP, C/N et I_{C_r} entre chitine commerciale</i>	93
<i>Tab.III.1 : Composition du substrat à t_0 de l'hydrolyse enzymatique</i>	99
<i>Tab.III.2 : Conditions du plan d'expérience : bornes des paramètres étudiés</i>	104
<i>Tab.III.3 : Description des conditions du plan d'expérience</i>	105
<i>Tab.III.4 : Légende des résultats du plan d'expérience</i>	106
<i>Tab.III.5 : Statistiques appliquées au degré de déminéralisation</i>	112
<i>Tab.III.6 : Statistiques appliquées au degré de déprotéinisation</i>	113
<i>Tab.III.7 : Statistiques appliquées au rapport C/N</i>	114
<i>Tab.III.8 : Statistiques appliquées au rendement massique après traitement chimique au NaOH</i>	115
<i>Tab.III.9 : Statistiques appliquées au rendement massique après traitement chimique au NaOH</i>	116
<i>Tab.III.10 : Comparaison des effets sur les différents aspects de l'hydrolyse par la pepsine</i>	116
<i>Tab.III.11 : Impact relatif des variables sur les deux composantes du modèle M_A</i>	122
<i>Tab.III.12 : Impact relatif des variables sur le modèle M_C</i>	125
<i>Tab.III.13 : Description détaillée des recherches de modélisation de la déprotéinisation</i>	126
<i>Tab.III.14 : Comparaison des caractéristiques des produits insolubles obtenus par hydrolyse enzymatique, par la pepsine et par l'ASP, après 6 h et 12 h de réaction</i>	137
<i>Tab.III.15: Récapitulatifs des performances atteintes après 6 h de protéolyse acide</i>	139
<i>Tab.IV.1 : Comparaison des performances d'extraction de la chitine par voies biologiques, Xu et al. 2008</i>	149
<i>Tab.IV.2 : Liste des bactéries utilisées par les tests d'activités antimicrobienne de la phase soluble</i>	159
<i>Tab.IV.3 : Comparaison des caractéristiques visuelles des résidus insolubles selon le procédé d'extraction</i> ...	165
<i>Tab.IV.4 : Comparaison des caractéristiques visuelles des résidus insolubles selon le procédé d'extraction</i> ...	165
<i>Tab.IV.5 : Comparaison des performances en purification de chitine en fonction du procédé</i>	168
<i>Tab.IV.6 : Comparaison des performances en purification de chitine en fonction du procédé</i>	168
<i>Tab.IV.7 : Comparaison de la production d'effluents chimique en fonction du procédé</i>	168

LISTE DES FIGURES

<i>Fig.1 : Représentation générale de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétylglucosamine</i>	3
<i>Fig.2 : Chitine et dérivés de la chitine</i>	3
<i>Fig.3 : Evolution du nombre de publication par année traitant de « chitine » ou « chitosan » sur Web of Science</i>	4
<i>Fig.4 : Schéma du procédé d'extraction de l'invention décrite par le brevet FR 11 54580, 24 mai 2011</i>	7
<i>Fig.I.1 : Répartition de la consommation moyenne de produits marins par habitant de 2003 à 2005</i> . 11	
<i>Fig.I.2 : Secteurs approvisionnés par la production de poissons dans le monde (sauf Chine) FAO 2009</i>	12
<i>Fig.I.3 : Contribution relative de l'aquaculture et des captures en mer dans la consommation humaine de PM</i>	12
<i>Fig.I.4 : Production de crevettes dans le monde, répartition entre la pêche (P) et l'aquaculture (A), FAO, 2006</i>	13
<i>Fig.I.5 : Répartition des pénéides élevées en aquaculture dans le monde, FAO, 2010</i>	13
<i>Fig.I.6 : Ventes de chitine en fonction des zones géographiques (D'après GIA, 2010)</i>	15
<i>Fig.I.7 : Procédé de fabrication de chitine-glucane par Kitozyme</i>	17
<i>Fig.I.8 : Évolution des domaines d'application pour lesquels le chitosan est employé (D'après GIA, 2010)</i>	22
<i>Fig.I.9 : Niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule de crabe <i>H. americanus</i> (Raabe, 2005)</i>	25
<i>Fig.I.10: (a) Motifs de Bouligand, CT de cuticule de homard en MEB, Raabe, 2006 ; (b) représentations schématiques de l'empilement des fibres, Pillai et al. 2009</i>	25
<i>Fig.I.11 : Structure en « nid d'abeilles » de cuticule de homard en CT par MEB (a) Pillai, 2009 (b) Raabe, 2006</i>	26
<i>Fig.I.12 : Structure de la cuticule normal (a) et décalcifiée (b) par MEB (Raabe, 2005)</i>	26
<i>Fig.I.13: Proposition de structure entre chitine et protéines, a) Stankiewicz et al. 1996 b) Hamodrakas, 2002</i>	27
<i>Fig.I.14 : Représentation idéale de la chitine (a) et son dérivé obtenu par désacétylation, le chitosan (b)</i>	28
<i>Fig.I.15: Arrangement des trois formes existantes de chitine : α, β et γ (Einbu 2007)</i>	29
<i>Fig.I.16: Maille cristalline</i>	30
<i>Fig.I.17 : Dispersion des masses moléculaires</i>	31
<i>Fig.I.18: Schémas de distribution des groupes acétyles le long de la chaîne carbonée du chitosan, a) PA=0: répartition par blocs uniformes, b) PA=1: répartition aléatoire et c) PA=2: répartition alternée entre A et D</i>	34
<i>Fig.I.19 : Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés (France Chitine)</i>	35
<i>Fig.I.20 : Schéma des réactions chimiques de désacétylation et dépolymérisation – Sigma-Aldrich, Tutorial</i>	39
<i>Fig.I.21: Schéma du procédé d'hydrolyse enzymatique par Beaulieu, 2009</i>	45
<i>Fig.I.22: Voies enzymatiques de conversion de la chitine en dérivés désacétylés et dépolymérisés (Jeon et al. 2000)</i>	48
<i>Fig.I.23 : Parts (en tonnage) des voies de valorisation de coproduits marins en France, Andrieux, 2004</i>	48
<i>Fig.I.24 : Mécanismes de digestion et d'absorption des protéines par l'organisme</i>	50
<i>Fig.I.25 : Schéma d'une membrane cellulaire, répartition des composés lipidiques</i>	51
<i>Fig.I.26 : La cuisson des crustacés modifie la conformation des pigments et donc change leur couleur</i>	51
<i>Fig.I.27 : Cristal de calcite, support de nanocristaux de brushite (Maity et al. 2011) et ciment de phosphate de calcium appliqué (Callos® Bone)</i>	53
<i>Fig.I.28 : Hypothèse de liaison entre chitine et protéines proposées par Armenta et Guerrero-Legarreta (2009)</i>	54

Fig.II.1 : Répartition des parts de produits et coproduits de crevettes (en pourcentage de poids humide).....	57
Fig.II.2 : Hydrolyse enzymatique d'exosquelette de crevette par la pepsine en milieu maintenu acide par H_3PO_4	65
Fig.II.3 : Spectre 1H RMN de chitosan, 600 MHz, en D_2O , à 65 °C, (Yang et Montgomery, 2000) ...	66
Fig.II.4 : Viscosimètre capillaire d'Ubbelohde	69
Fig.II.5 : Dispositif d'analyse thermogravimétrique (Source Web, Wikipedia).....	70
Fig.II.6 : Composition en acides aminés de l'exosquelette de crevette – comparaison par laboratoires	73
Fig.II.7 : Principaux composés présents dans la matière première en fonction de la catégorie de taille ($n > 3$).....	75
Fig.II.8 : Cinétique d'hydrolyse enzymatique (25 % de pepsine/prot – 40 °C – taille < 1mm).....	76
Fig.II.9 : Variations de teneur en azote pour différents composés azotés (P et Q).....	79
Fig.II.10 : Pourcentage de chitine (Q) et de protéines (P), minimal (---) et maximal (–) en fonction de Nt	79
Fig.II.11 : Comparaison des méthodes de quantification de la chitine (en rouge, via le bilan massique ; en bleu, via le lavage au NaOH ; en vert, via l'analyse élémentaire ; en orange, via le C_p déterminé par CPG).....	80
Fig.II.12 : Corrélations entre les méthodes de quantification de la chitine (NaOH= via le traitement chimique, Bilan = via le bilan massique, N (AE) = via l'analyse élémentaire, Naa = via la composition en acides aminés	81
Fig.II.13: Evolution du rapport C/N en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique (25 % pepsine, 40 °C).....	82
Fig.II.14 : Thermogramme de produits de différents degrés de pureté (1 °C/min)	84
Fig.II.15 : Relation entre la perte de masse de la 1 ^{ère} étape et la quantité de protéines.....	86
Fig.II.16 : Relation entre l'estimation du taux de pureté et la quantité de protéines résiduelles d'une part et l'étendue de la première plage de température de décomposition d'autre part.....	86
Fig.II.17 : Superposition des spectres RMN ^{13}C de la chitine commerciale (Sigma), en bleu, et de la matière première, en rouge	87
Fig.II.18 : Spectres de spectroscopie FT-IR de la chitine commerciale Sigma (en bleu), extraite par voie chimique (en rouge) et enzymatique (en vert) au laboratoire.	88
Fig.II.19 : Superposition des spectres RMN ^{13}C de la chitine commerciale (Sigma), en bleu, et de la matière première, en rouge	90
Fig.II.20 : Spectre RMN 1H de la chitine commerciale.....	90
Fig.II.21 : Spectre FT-IR sur le résidu solide de 6 h l'hydrolyse par 25 % de pepsine à 40 °C, (analyse menée par le laboratoire BMM).....	91
Fig.II.22 : Déconvolution du spectre de diffraction aux rayons X de la chitine commerciale Mahtani	92
Fig.II.23 : Comparaison visuelle entre le produit d'extraction chimique (a) et le produit d'hydrolyse enzymatique(b)	93
Fig.III.1 : Composition des produits traités par l'acide phosphorique en fonction du temps	98
Fig.III.2 : Représentation schématique de la pepsine (Source Web, http://dwb4.unl.edu).....	99
Fig.III.3 : Mécanisme proposé pour la protéolyse par les aspartate-protéases (Reginald et al. 1974)	100
Fig.III.4 : Conditions de pH (A) et T°(B) optimales de protéolyse	100
Fig.III.5 : Modèle selon Michaëlis-Menten, de la vitesse de réaction en fonction de la consommation en substrat	101
Fig.III.6 : Comparaison sur la chitosanolyse selon 3 protéases différentes, effet de la concentration en enzyme (A), du pH (B), de la température (C) et de la concentration en substrat (D), Kumar et Tharanathan 2004	102
Fig.III.7 : Représentation schématique d'un plan factoriel complet d'expérience 2^k	103
Fig.III.8 : Réponses du plan d'expérience : analyses de caractérisation des produits d'hydrolyse étudiées.....	105
Fig.III.9 : Rendement massique en fonction de la durée d'hydrolyse – Plan d'expérience.....	106
Fig.III.10 : Quantité de minéraux éliminés en fonction de la durée d'hydrolyse – Plan d'expérience	107

<i>Fig.III.11 : Quantité de protéines éliminées en fonction de la durée d'hydrolyse – Plan d'expérience</i>	107
<i>Fig.III.12 : Evolution du rapport C/N en fonction de la durée d'hydrolyse – plan d'expérience.....</i>	108
<i>Fig.III.13 : Evolution du pourcentage d'azote en fonction de la durée d'hydrolyse – plan d'expérience</i>	109
<i>Fig.III.14 : Estimation du degré de pureté de chitine par lavage au NaOH – Plan d'expérience.....</i>	109
<i>Fig.III.15 : Estimation de la quantité absolue de chitine par lavage au NaOH – Plan d'expérience</i>	110
<i>Fig.III.16 : Degrés d'élimination (%) des minéraux (a) et des protéines (b) en fonction de l'expérience</i>	110
<i>Fig.III.1 : Estimation du degré de pureté (a) et rapport C/N (b) en fonction de l'expérience.....</i>	111
<i>Fig.III.18 : Représentation du degré de déminéralisation en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine, à 40°C, selon l'équation III.2</i>	113
<i>Fig.III.19 : Représentation du degré de déprotéinisation en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine et 40°C.....</i>	114
<i>Fig.III.20 : Représentation du rapport C/N en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine et 40°C</i>	115
<i>Fig.III.21 : Représentation du rendement massique en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine et 40°C.....</i>	116
<i>Fig.III.22 : Hydrolyse enzymatique par 25 % de pepsine (T° 40 °C –Taille < 1 mm).....</i>	118
<i>Fig.III.23 : Hydrolyse enzymatique par 41 % de pepsine (T°40 °C – Taille < 1 mm).....</i>	118
<i>Fig.III.24 : Comparaison des méthodes de quantification de la chitine (en rouge, via le bilan massique ; en bleu, via le lavage au NaOH ; en vert, via l'analyse élémentaire ; en orange, via le C_p déterminé par CPG).....</i>	119
<i>Fig.III.25 : Comparaison des extractions par 25 % de pepsine entre 6 h et 12 h d'hydrolyse (n=3)</i>	119
<i>Fig.III.26 : Étapes du mécanisme d'hydrolyse enzymatique (Hosseini et al. 2011)</i>	121
<i>Fig.III.27 : Confrontation entre le modèle M_A et les mesures observées, sse = 136 et rmse = 1,01 ..</i>	123
<i>Fig.III.28 : Confrontation entre le modèle M_B et les mesures observées, sse = 205, rmse = 1,21</i>	124
<i>Fig.III.29 : Confrontation entre le modèle C et les mesures observées, sse = 118 et rmse = 0,93</i>	124
<i>Fig.III.30 : Confrontation entre la déprotéinisation prédite et les mesures observées, sse = 1087 et rmse = 3,14</i>	126
<i>Fig.III.31 : Effets inhibiteur et activateur selon l'affinité avec les effecteurs forte (a) ou faible (b)..</i>	127
<i>Fig.III.32 : Interaction et formation du complexe ENZYME-SUBSTRAT-EFFECTEUR.....</i>	127
<i>Fig.III.33 : Confrontation entre la déprotéinisation prédite et les mesures observées, sse = 1072 et rmse = 3,08</i>	128
<i>Fig.III.34 : Représentation du prix de vente de la chitine en fonction du coût de production (J)</i>	130
<i>Fig.III.35 : Cinétique de la composition de la phase soluble – Hydrolyse de référence</i>	131
<i>Fig.III.36 : Quantités de minéraux dans les phases solubles et insolubles au cours de la réaction...</i>	132
<i>Fig.III.37 : Quantités de protéines dans les phases solubles et insolubles au cours de la réaction...</i>	133
<i>Fig.III.38 : Composition de la phase soluble après 6 h d'extraction enzymatique (cinétique de référence)</i>	133
<i>Fig.III.39 : Caractéristiques techniques de l'Acide Stable Protéase, analysées par Bio-Cat Inc</i>	134
<i>Fig.III.40 : Comparaison du rendement massique (a), de la quantité de minéraux résiduels (b) et des protéines résiduelles (c) en fonction de l'acide employé</i>	135
<i>Fig.III.41 : Composition des résidus solides de l'hydrolyse par 25 % d'ASP à 45 °C, pH 2,7.....</i>	136
<i>Fig.III.42 : Comparaison des performances d'extraction enzymatique selon l'acide employé, de part les degrés de déminéralisation et de déprotéinisation (a), le rendement massique et la quantité de chitine (b), n=3.....</i>	137
<i>Fig.IV.1 : Conséquence de la déminéralisation et déprotéinisation chimique sur la composition des produits.....</i>	145
<i>Fig.IV.2 : Comparaison des degrés de déminéralisation en fonction des procédés d'extraction.....</i>	146
<i>Fig.IV.3 : Comparaison des degrés de déprotéinisation en fonction du procédé d'extraction.....</i>	147
<i>Fig.IV.4 : Degré d'acétylation des principales chitines produites par voie enzymatique et chimique</i>	151
<i>Fig.IV.5 : Degré de polymérisation des principales chitines produites par voie enzymatique et chimique</i>	152

<i>Fig.IV.6 : Indice de cristallinité des principales chitines produites par voie enzymatique et chimique</i>	153
<i>Fig.IV.7 : Profils d'ATG de la chitine commerciale (Mahtani) et du produit de l'extraction enzymatique modèle</i>	154
<i>Fig.IV.8 : Micrographies de MEB du produit de 6 h d'hydrolyse par 25 % de pepsine à 40 °C</i>	155
<i>Fig.IV.9 : Organisation schématique de la cuticule de homard, coupe transversale, Raabe et al. 2006</i>	156
<i>Fig.IV.10 : Micrographes de MEB d'exosquelettes soit déminéralisés (a) ou déprotéinisés (b) par traitement chimique</i>	156
<i>Fig.IV.11 : Schéma de la cuticule des crustacés, ep = épicuticule, pi = couche pigmentaire, pr = couche principale, E = cellules épithéliales, p.c. = canaux de ports transversaux, i.s. = septum interprismatique, Giraud-Guille, 1984</i>	157
<i>Fig.IV.12 : Évolution des poids moléculaire des peptides solubles produits par l'extraction enzymatique (par 25 % de pepsine, en acide phosphorique, à 40 °C) selon la durée d'hydrolyse</i>	158
<i>Fig.IV.13 : Évolution des poids moléculaire des peptides solubles produits par l'extraction enzymatique (par 41 % de pepsine, en acide phosphorique, à 40 °C) selon la durée d'hydrolyse</i>	159
<i>Fig.IV.14 : Évolution des poids moléculaire des peptides solubles produits par l'extraction enzymatique (par 25 % d'ASP en acide formique à 40 °C) selon la durée d'hydrolyse</i>	160
<i>Fig.IV.15 : Quantités d'acides aminés résiduels dans les produits insolubles de l'extraction enzymatique par 25% de pepsine à 40°C (petite taille) en fonction de la durée d'hydrolyse</i>	161
<i>Fig.IV.16 : Répartition des catégories de résidus glycosidiques dans la phase soluble des extractions enzymatiques</i>	162
<i>Fig.IV.17 : Caroténoïdes présents dans la phase soluble de l'hydrolyse à 25 % de pepsine, 6 h à 40 °C</i>	164
<i>Fig.IV.18 : Comparaison des coefficients de spectrophotométrie</i>	166
<i>Fig.IV.19 : Chitine obtenue par lavage chimique, par hydrolyse par la pepsine et par l'ASP (de gauche à droite)</i>	166
<i>Fig.IV.20 : Schéma récapitulatif des étapes du procédé de protéolyse acide et des analyses consécutives</i>	167

ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
ABVT	Azote basique volatil total
ATG	Analyse ThermoGravimétrique
BSA	Sérum albumine bovine
CHOS	Chitooligosaccharides
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CS	Chitine-synthétase
CT	Coupe transversale
Da	Dalton
DA	Degré d'acétylation
DCO	Demande chimique en Oxygène
DD	Degré de désacétylation
DCI	Deuterated hydrochloric acid
DSC	Differential scanning calorimetry
DHA	Acide docosaénoïque
DP :	Degré de polymérisation
EPA	Acide eicosapentaénoïque
F _A ; F _D	Fraction des unités acétylées ; Fraction des unités acétylées
FID	Détection par ionisation de flamme
GC/MS	Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse
HPLC	Chromatographie en phase liquide
JO	Journal Officiel
LMWC	Chitosan de très faible masse molaire (opposé à HMWC)
MES	Matières en suspension
Mdt	Milliard de tonnes
Mt	Million de tonnes
NMR	Résonance magnétique nucléaire
PA	« Pattern of N-acetylation »
PER	Pourcentage d'efficacité des protéines (Protein Efficiency Ratio)
USD	United States Dollar

Abréviations chimiques

CH ₃ COCH ₃	Acétone
(COOH) ₂	Acide oxalique
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	Bis-dihydrogénophosphate de calcium
CaHPO ₄	phosphate de calcium de formule (brushite)
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Tricalcium phosphate
CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	Éthyle-acétate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HNO ₂	Acide nitreux
KBr	Potassium bromide
KMnO ₄	Permanganate de potassium
KNaC ₄ H ₄ O ₆	Tartrate de sodium et potassium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium
NaBH ₄	Sodium borohydride
NaClO	Hypochlorite de sodium

Introduction

Généralités

La chitine a été isolée pour la première fois, en 1811, par un chercheur français, Henri Braconnot, sur un champignon. Son dérivé, le chitosan a été découvert en 1859 par Charles Rouget alors qu'il chauffait la chitine avec du KOH concentré.

Ce polymère est un des plus abondants sur Terre, à la fois dans le milieu terrestre et marin. Il est traditionnellement extrait à partir des carapaces des crustacés depuis les années 70, pour des domaines d'application variés, tels que la pharmaceutique, la cosmétique, la diététique et le traitement des eaux. Il est composé d'un squelette carboné linéaire, des unités de glucosamine et de N-acétylglucosamine (Fig.1).

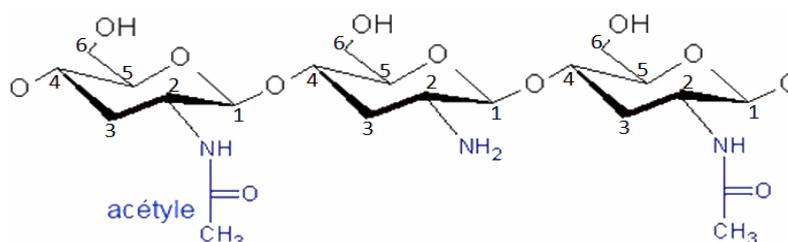


Fig.1 : Représentation générale de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétylglucosamine

La chitine et le chitosan sont principalement caractérisés par leur degré de polymérisation (DP), c'est-à-dire par le nombre d'unités qui constituent la chaîne du polymère, et par leur degré d'acétylation (DA), c'est-à-dire le pourcentage d'unités acétylées. Ces paramètres modulent par exemple la densité de charge du polymère, et donc sa solubilité et ses bio-fonctionnalités. D'autres caractéristiques sont parfois mesurées en raison de leur influence sur les propriétés du polymère, tels que l'indice de cristallinité et la poly-dispersion des unités de glucosamine (Glu) et N-acétylglucosamine (NacGlu). Les applications de la chitine et de ses dérivés sont liées à leurs propriétés et par conséquent à ces caractéristiques (Kasaai, 2010).

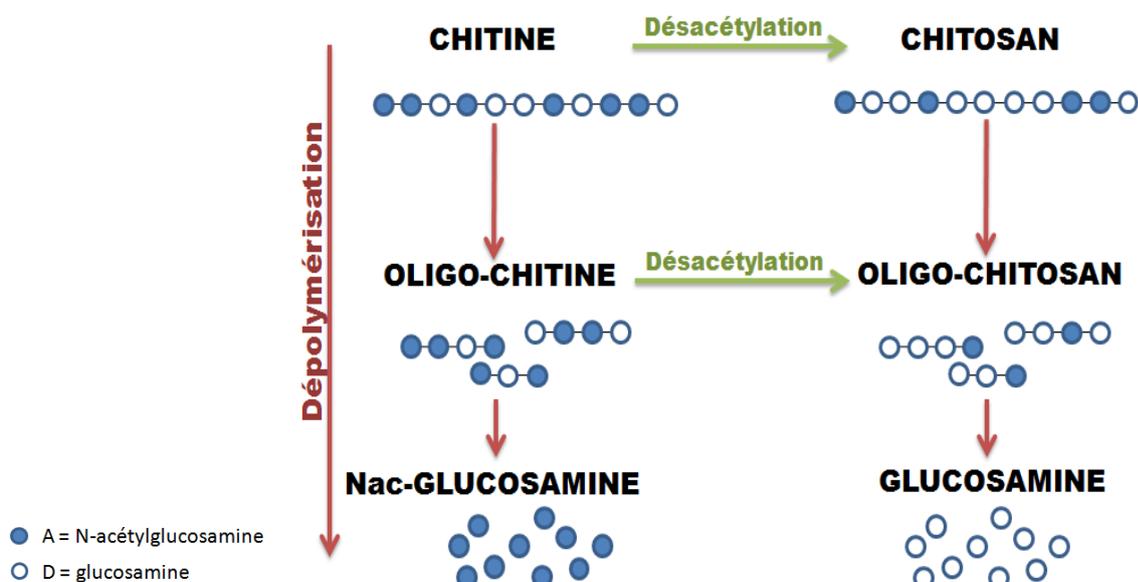


Fig.2 : Chitine et dérivés de la chitine

Les principaux dérivés de la chitine et les mécanismes pour les produire sont schématisés par

Introduction

la figure 2. Par désacétylation, la chitine est convertie en chitosan, tandis que la dépolymérisation réduit la chitine en oligomères. Si le procédé est mené à son terme, le polymère est entièrement converti en résidus de Glu ou NacGlu. La dépolymérisation appliquée au chitosan produit des oligomères de chitosan puis des unités de glucosamine.

La recherche s'intéresse de plus en plus à la chitine et ses dérivés

Le nombre de publications sur le thème de la chitine et ses dérivés ne cesse de s'étendre depuis 1970. Cette année-là, le nombre de publication portant sur la chitine ou le chitosan était de 40, d'après la base Web of Science, alors qu'il atteint 5 260 en 2011. Avant 1960, le nombre d'études publiées par an sur ce thème était inférieur à 5. La figure 3 illustre cette évolution. D'après les conclusions de ces publications, ces produits sont promis à un bel avenir. Leurs propriétés biologiques et rhéologiques sont encore sous-exploitées par rapport à leurs potentiels, par exemple comme films alimentaires. De nombreux laboratoires s'investissent dans la mise au point de nouvelles applications, notamment dans le domaine médical. De plus, il existe un engouement pour les produits d'origine naturelle et de surcroît d'origine marine.

Les premiers brevets concernant le chitosan semblent dater des années 30 (Rigby, 1934 et 1935) et son application concernait la fabrication de biofilms (Shahidi, 2002). Au cours de l'année 2010, la littérature sur la chitine et le chitosan s'est enrichie de nombreuses revues qui constituent de réels atouts pour la poursuite des études dans ce domaine. Les laboratoires leaders se situent majoritairement en Asie, où se situe également la majorité de la production et des applications.

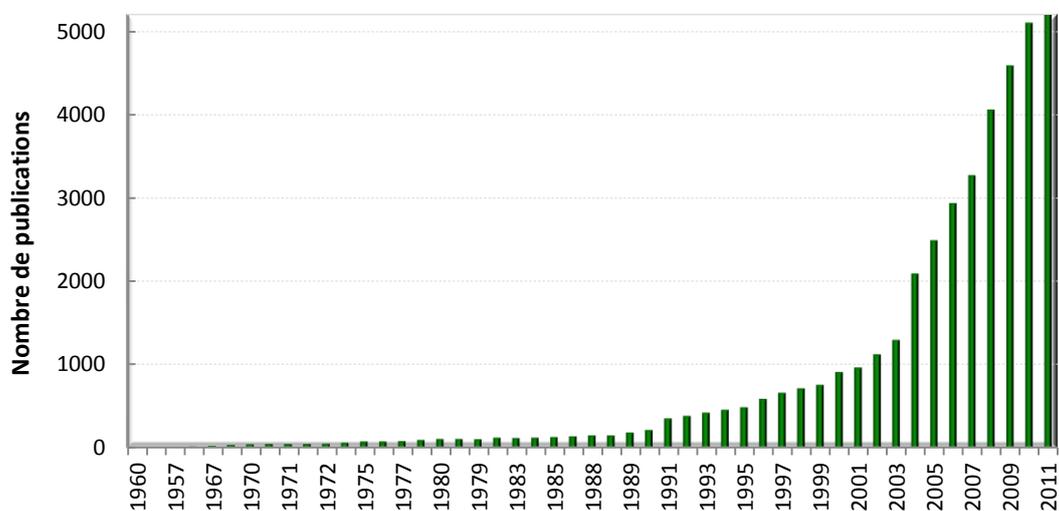


Fig.3 : Evolution du nombre de publication par année traitant de « chitine » ou « chitosan » sur Web of Science

Les enjeux de l'étude

La thématique de cette étude s'inscrit dans la valorisation des coproduits de crustacés. La chitine est l'un des constituants majoritaires de l'exosquelette des crustacés. Son extraction est habituellement réalisée par traitement chimique. Elle repose principalement sur deux étapes :

- la **déminéralisation**, par hydrolyse acide, pour éliminer les minéraux ;
- la **déprotéinisation**, par hydrolyse basique, pour éliminer les protéines.

Ce procédé chimique consomme de grandes quantités d'eau et de réactifs (principalement l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium et des agents de blanchiment) qui sont nocifs pour les manipulateurs, les équipements et l'environnement. De plus, l'étape de déprotéinisation basique se fait en général à chaud et donc nécessite un apport énergétique conséquent. En outre, les étapes de lavage génèrent des volumes très importants d'effluents pollués, dont le recyclage engendre un coût. Enfin, le procédé d'extraction chimique risque de dénaturer la structure de la chitine et ne permet pas la valorisation des autres composés des coproduits de crustacés, tels que les peptides et les pigments (Crini et al. 2009).

À l'inverse, un procédé biologique de purification de la chitine répondrait mieux aux enjeux actuels de développement durable. Son empreinte sur l'environnement devrait être réduite car les volumes d'effluents chargés en réactifs chimiques sont plus faibles. Ses conditions plus douces devraient préserver la qualité de la chitine. Enfin elles devraient également favoriser la valorisation des autres constituants, présents dans les coproduits de crustacés. Il s'agit notamment des peptides et des pigments.

Les expériences d'extraction de chitine par voie fermentaire et enzymatique seront décrites au cours du premier chapitre de ce manuscrit. Par ces voies, les taux de protéines et minéraux résiduels sont plus importants par rapport à l'emploi de l'extraction chimique. Des traitements complémentaires sont souvent nécessaires pour améliorer le degré de pureté en chitine. Enfin, les temps de réaction sont beaucoup plus longs que par la voie chimique.

L'idée directrice de l'étude

Dans ce contexte, la présente étude prétend appliquer un traitement enzymatique optimisé afin d'extraire la chitine des coproduits de crustacés. Conscients des contraintes économiques et environnementales actuelles, le procédé décrit aura pour principe de fusionner les deux principales étapes de l'extraction de la chitine en une seule étape. Cela a pour conséquence directe une réduction du risque de perte de produit au cours des étapes de lavage et une réduction de temps par rapport aux précédents traitements biologiques.

L'idée directrice de cette étude est d'utiliser des protéases à même de fonctionner à pH acide, afin de réunir les deux étapes de déminéralisation et déprotéinisation en une seule étape de protéolyse acide.

Pour favoriser la déminéralisation et la déprotéinisation, le pH du milieu doit être proche d'un pH optimisé pour réaliser ces deux réactions simultanément. De plus il doit préserver l'intégrité structurelle et fonctionnelle des composés hydrolysés. Enfin, son innocuité doit être garantie pour envisager d'éventuelles applications dans les domaines de l'agroalimentaire, de la nutraceutique et des cosmétiques.

Les objectifs sous-jacents concernent d'une part l'approche méthodologique pour caractériser le substrat et les produits obtenus. D'autre part, une étude des paramètres qui influencent les performances du procédé est nécessaire pour son optimisation.

Présentation des objectifs et organisation du manuscrit

Le premier chapitre situe le contexte de la filière des coproduits marins sur le marché actuel et retrace l'état de l'art concernant la chitine et ses dérivés. Un accent particulier est porté sur le lien entre les caractéristiques de la chitine ou de ses dérivés et leurs propriétés. Notre sujet s'inscrivant dans une réflexion sur la valorisation maximale des coproduits de crustacés, l'exploitation des autres composés présents (protéines, minéraux et pigments) est également étudiée.

La caractérisation de la matière première, de la chitine commerciale et des produits issus du procédé enzymatique est nécessaire. Elle consiste à déterminer la composition de ces produits et leurs caractéristiques physico-chimiques. Au cours du chapitre 2, plusieurs méthodes sont comparées et discutées. Elles font face à la difficulté de séparer la chitine et les protéines. Une stratégie analytique est mise en œuvre pour estimer au mieux la composition des produits et le degré de pureté en chitine (ou à l'inverse son degré d'impuretés). Cette stratégie permet d'estimer les performances du procédé.

Le chapitre 3 traite des paramètres influençant les performances de l'extraction enzymatique. Ils permettent d'optimiser et de contrôler les conditions du procédé. Les paramètres étudiés sont la température, la concentration en enzymes et la taille des fragments de matière première. Un plan d'expérience est réalisé pour suivre les cinétiques de déminéralisation et de déprotéinisation. D'après les résultats obtenus, le domaine d'étude est étendu, notamment avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Un travail est alors entrepris pour modéliser les cinétiques de déminéralisation et de déprotéinisation. Sur la base du modèle retenu, un travail préliminaire d'optimisation du procédé est engagé. Il permet d'identifier nos conditions de référence. L'utilisation d'une autre enzyme et d'un autre acide est explorée. Une validation du bilan massique des deux phases issues de l'hydrolyse enzymatique est proposée. Ce procédé de purification de la chitine en une seule étape par voie enzymatique, a fait l'objet d'un dépôt de brevet (FR 11 54580 ; Fig.4).

Le chapitre 4 compare les performances du nouveau procédé par rapport à l'extraction chimique traditionnelle, sur la base de critères de caractérisation tels que les degrés d'acétylation et de polymérisation, ainsi que l'indice de cristallinité. La structure des résidus solides, supposés être majoritairement de la chitine, est observée par microscopie à balayage électronique. Une analyse plus fine des composés solubilisés par l'hydrolyse enzymatique est ensuite proposée.

La dernière partie soulignera les principales conclusions apportées par ce travail.

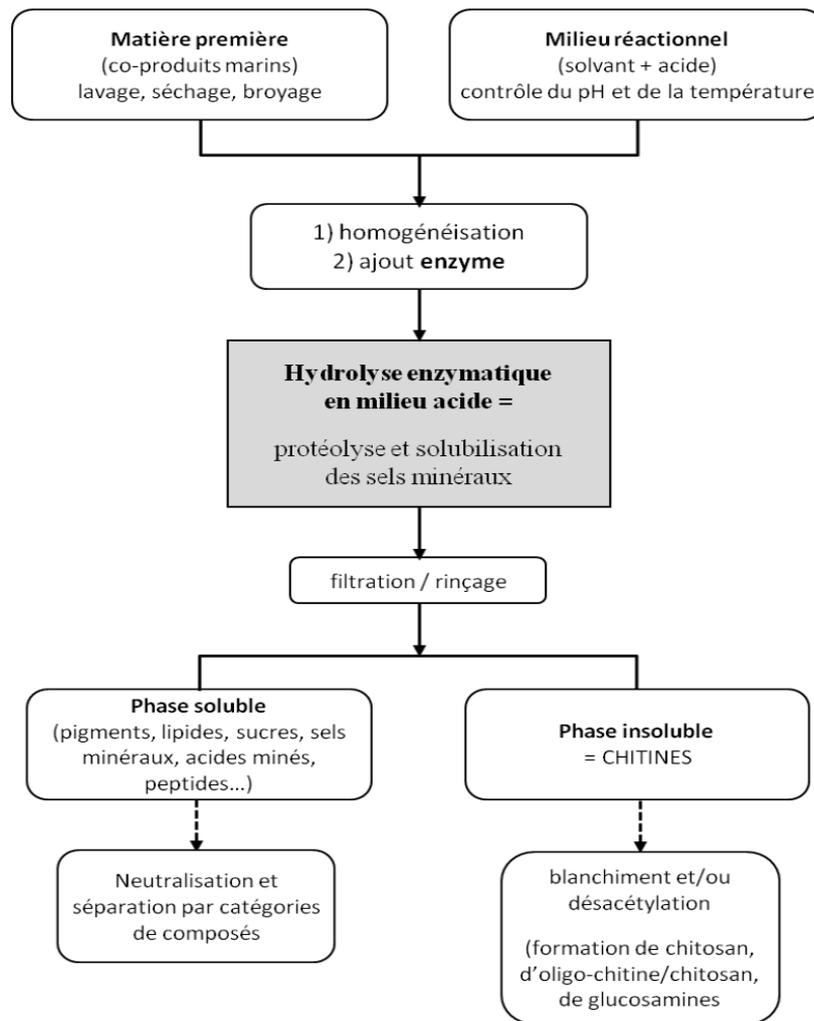


Fig.4 : Schéma du procédé d'extraction de l'invention décrite par le brevet FR 11 54580, 24 mai 2011.

Chapitre 1 – Etude bibliographique

I. Contexte économique

I.1. Évolution du marché des produits marins, focus sur les crustacés

Le marché des produits aquatiques ne cesse d'augmenter à l'échelle internationale. La forte hausse de la demande est principalement liée à l'augmentation de la consommation humaine. Elle représentait 0,7 Kg par habitant en 1970 tandis qu'elle a atteint 7,8 Kg par habitant en 2008, soit une augmentation de 6,6 % par an (FAO, 2010).

La consommation de produits marins est inégalement répartie sur la surface de la planète, comme le montre la figure I.1 (FAO, 2008).

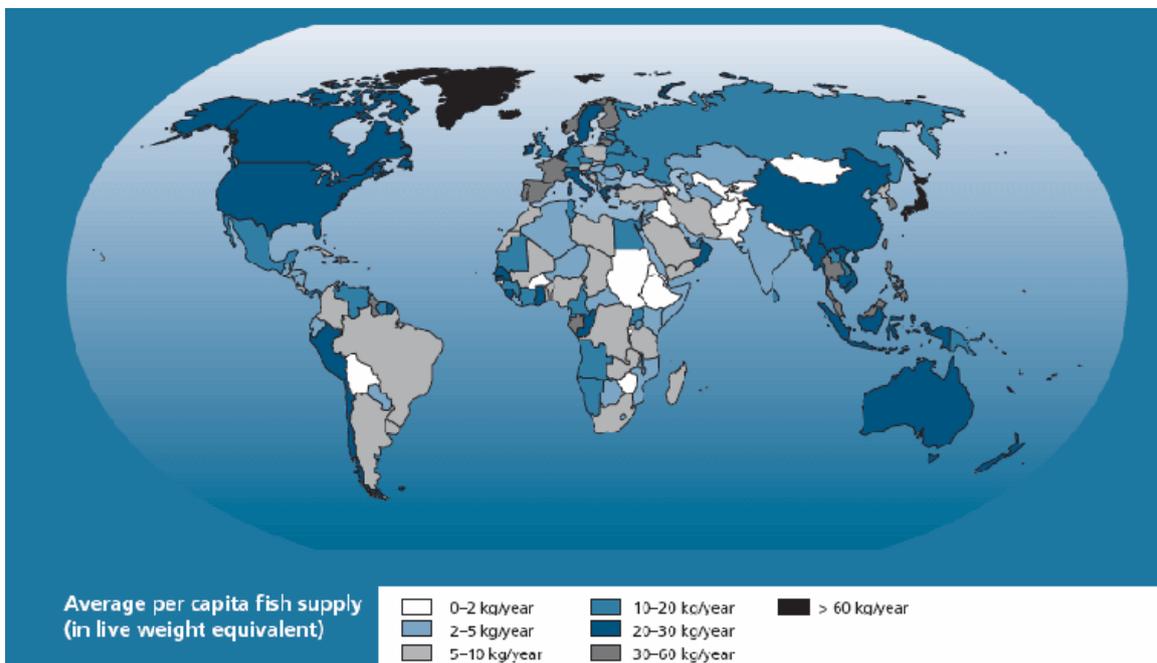


Fig.I.1 : Répartition de la consommation moyenne de produits marins par habitant de 2003 à 2005

Cette répartition inégale est le reflet de valeurs traditionnelles et culturelles, de la disponibilité en ressources marines et de critères socio-économiques. La consommation est la plus élevée au Groenland et au Japon. Elle est la plus faible en Afrique. Elle est importante en Asie-Indonésie-Océanie, en Europe Occidentale, en Amérique du Nord, Centrale et sur la côte chilienne.

La consommation humaine de produits marins a atteint 72,1 Mt en 2006. Son augmentation suit celle de la population. Les utilisations non-alimentaires ont augmenté jusqu'à la fin des années 90 (Fig.I.2) et contribue à l'effort de pêche mondial. La principale utilisation non-alimentaire est la production de nourriture pour l'alimentation animale, notamment pour l'aquaculture.

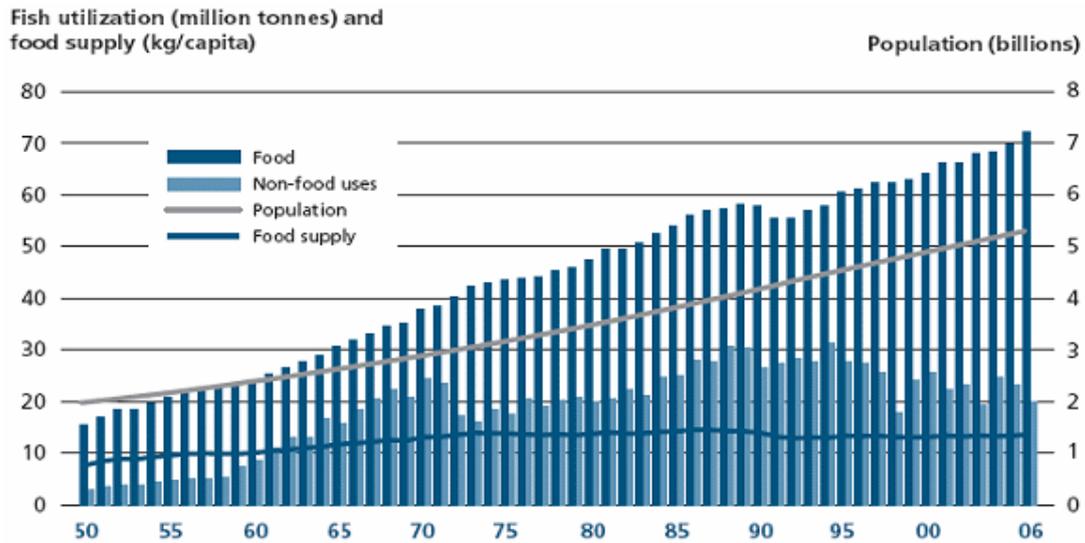


Fig.I.2 : Secteurs approvisionnés par la production de poissons dans le monde (sauf Chine) FAO 2009

La hausse de la production s’explique par la progression de la production aquacole depuis le milieu des années 80. Cette part de l’aquaculture doit être pondérée par la place de l’Asie, notamment la Chine, dont la production de poissons d’élevage présente une forte ascension depuis les vingt dernières années (Fig.I.3. FAO, 2009).

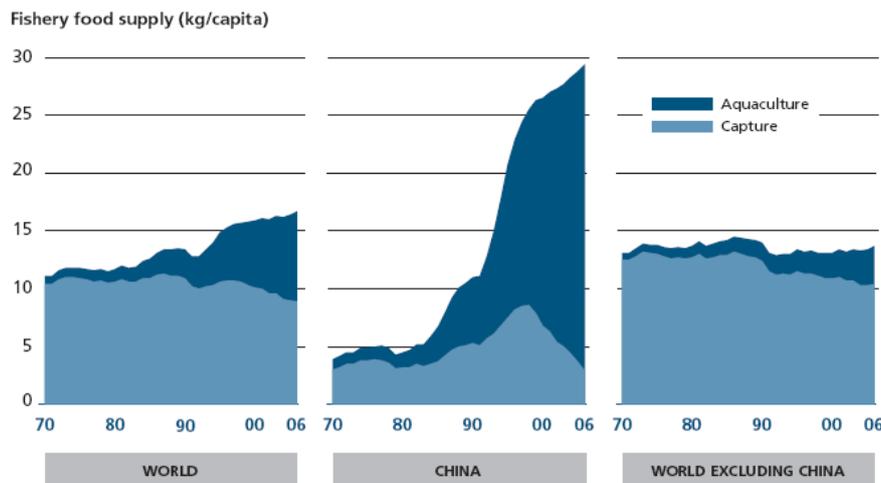


Fig.I.3 : Contribution relative de l’aquaculture et des captures en mer dans la consommation humaine de PM

Avant la crise de 2009, l’augmentation de la consommation était particulièrement marquée pour les crustacés, principalement la crevette. La consommation mondiale est passée de 0,4 kg/hab en 1961 à 1,6 kg/hab en 2005. Aujourd’hui, la crevette est la première valeur échangée parmi les produits marins. Sa production annuelle mondiale était estimée à plus de 6 Mt en 2005. La région Asie-Pacifique, et notamment la Chine, la Thaïlande, le Vietnam, l’Indonésie et l’Inde, est la principale productrice, totalisant près de 88 % des productions (FAO, 2009 ; GLOBEFISH, 2011). Les exportations de crevettes atteignent 14 milliards de dollars par an, soit 16 % des produits marins.

La part de l'aquaculture représente 70 % de la production mondiale de crevettes et plus généralement 76 % pour l'ensemble des crustacés (FAO, 2006). Cependant, la répartition entre l'aquaculture et la pêche de crevettes est très inégale selon la région du globe (Fig.I.4).

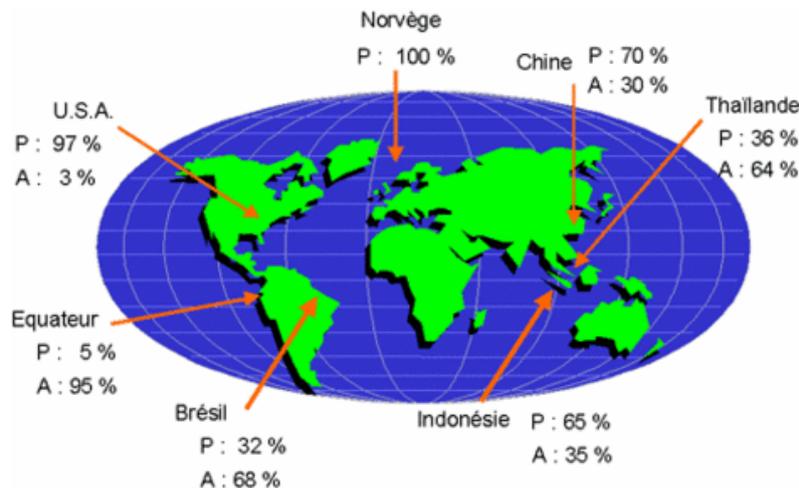


Fig.I.4 : Production de crevettes dans le monde, répartition entre la pêche (P) et l'aquaculture (A), FAO, 2006

Les crevettes sont généralement traitées aux métabisulfites à la sortie de l'eau, pour éviter leur dégradation et le noircissement des carapaces par oxydation, (Chantereau, 1991). Elles sont vendues soit fraîches, soit congelées, cuites ou marinées. De plus, elles sont proposées entières ou décortiquées. En 2010, la plus forte augmentation était la part des crevettes cuites et décortiquées. Généralement, cette forme de produit est destinée à une post-transformation, telle que la fabrication de brochettes de la mer ou de plats préparés.

L'une des espèces de crevette les plus commercialisées est la crevette tropicale, dite crevette à patte blanches, *Penaeus vannamei*. À l'origine, elle était cultivée uniquement sur la côte Pacifique de l'Amérique latine. Depuis sa production s'est étendue. Elle a atteint 67 % de la production mondiale en 2008 (FAO, 2010), soit 70 % des pénéides (Fig. I.5). La consommation de *P. vannamei* est très prisée. Elle a augmenté de 58 % en Asie et de 211 % en Amérique latine entre 2001 et 2006.

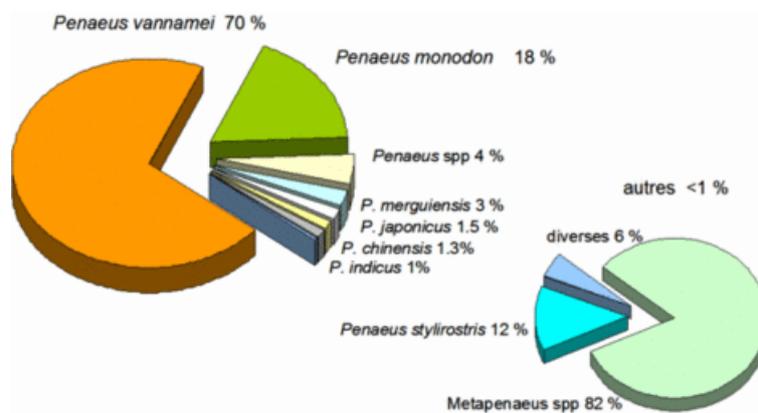


Fig.I.5 : Répartition des pénéides élevées en aquaculture dans le monde, FAO, 2010

L'augmentation de la production des crustacés entraîne une augmentation du volume de leurs coproduits¹. Des plateformes de décorticage de crevettes existent notamment au Maroc et en Asie. Leur principale voie de valorisation est la production de chitine, l'un des composés majoritaires des cuticules de crustacés.

I.2. Valorisation des coproduits marins : la chitine et ses dérivés

Les coproduits marins désignent les parties (de poissons, céphalopodes, crustacés, etc.) issues d'un procédé de transformation pour la consommation humaine (filetage, éviscération, étêtage, pelage ou cuisson). Il s'agit des peaux, arêtes, têtes, queues, ou carapaces. Leur valorisation n'est pas une préoccupation récente. Ils font l'objet d'une attention particulière du fait de la valeur ajoutée qu'ils apportent aux procédés industriels classiques (Cf. section VIII).

Valorisation des coproduits de crustacés : la production de chitine

Les coproduits de crustacés représentent plus de 60 % du poids frais (Wang et al. 2011). Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide ancien constitue l'exosquelette des crustacés. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés ne cessent de s'étendre (Cf. section III).

La production de chitine se situe en majorité en Asie-Pacifique. Les coproduits de crustacés y sont disponibles et la législation liée au retraitement des effluents est peu contraignante. En 2004, on répertoriait 63 producteurs de chitine ayant une place importante sur le marché, dont la moitié en Asie (Montfort-Windels, 2004). Le Japon est le premier producteur (FAO, 2009).

Pour la plupart des applications, la chitine n'est pas utilisée directement. Elle est convertie, principalement en chitosan et chitooligosaccharides (Fig.2, p3). La production de chitine était de l'ordre de 25 000 tonnes en 2006, dont près de 8 000 tonnes pour sa conversion en chitosan (GIA, 2010). En 2000, 10 000 tonnes de chitine étaient produites (Kurita, 2006), dont près de 6 667 T pour la fabrication de glucosamine, 2 667 T pour le chitosan et 1 000 T pour les oligosaccharides. Le marché de la chitine n'a cessé de croître comme en témoigne la figure I.6. Les ventes de chitine ont atteint près de 25 000 tonnes en 2006 (GIA, 2010).

¹ Les coproduits se définissent comme étant la matière issue du processus de fabrication d'un produit principal. Tout comme le produit fini principal, les coproduits doivent se soumettre à une réglementation spécifique pour être utilisés directement ou indirectement dans l'industrie

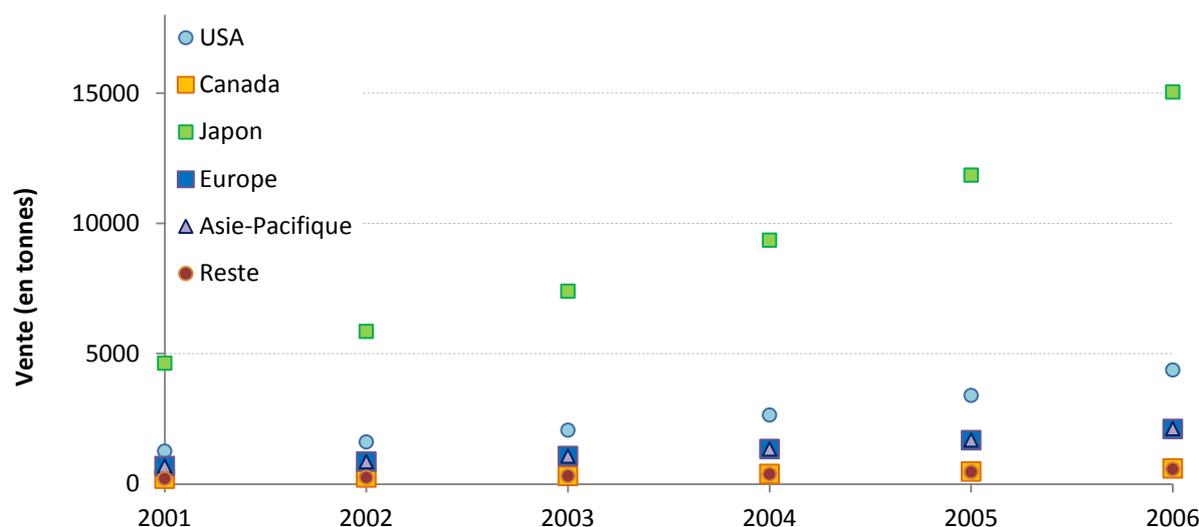


Fig.I.6 : Ventes de chitine en fonction des zones géographiques (D'après GIA, 2010)

D'après la figure I.6, le Japon domine nettement le marché de la chitine. Il participe à 61 % des ventes mondiales. Les perspectives annoncées à l'horizon 2015 maintiennent globalement ces écarts entre les régions. La production de chitine atteindrait près de 63 000 tonnes (GIA, 2010).

En 2006, 60 % de la chitine a été convertie en glucosamine. Ceci place la glucosamine au premier rang des volumes de ventes. Le second dérivé est le chitosan, dont la part des ventes représente près de 34 %. Cependant, ces chiffres masquent des disparités régionales. Par exemple, en Asie-Pacifique la même année, la part du chitosan est supérieure à celle de la glucosamine (50 % contre 46 %). Au contraire, le Japon consomme 25 % de chitosan contre plus de 66 % de glucosamine. Les perspectives tendent vers une très légère diminution de la part des « autres dérivés » au profit de la glucosamine et du chitosan (GIA, 2010).

L'Asie produit de la chitine à un coût très compétitif. En Chine, 90 % de ce coût correspond au prix des matières premières et des réactifs (CCM International, 2009). Le tableau I.1 montre les différences de prix en fonction des catégories de dérivés de chitine (Einbu, 2007a).

Dérivés	Production (T)	Chitine consommée (T)	Prix du marché (USD/Kg)
Glucosamine	4 500	9 000	7 – 35
Chitosan	3 000	4 000	10 – 100
Oligosaccharides	500	1 000	50 – 100
N-acétylglucosamine	100	200	20 – 140

Tab.I.1 : Production de dérivés à partir de chitine et gamme de prix (Einbu, 2007a)

Le principal critère qui définit le prix est le taux de pureté, lui-même lié au procédé d'extraction de la chitine. Einbu (2007a) rapporte des prix bien plus élevés pour des dérivés de très forts degrés de pureté, de l'ordre de 10 000 USD/Kg pour des oligosaccharides ultra-purs et 50 000 USD/Kg pour le chitosan. Les prix de la N-acétylglucosamine obtenue par voie chimique et par voie enzymatique sont de l'ordre de 20 USD/Kg et de 100 à 140 USD/Kg respectivement.

I.3. Disponibilité de la chitine, ressource naturelle

La chitine est l'un des polymères naturels les plus abondants sur le globe avec la cellulose (Khanafari et al. 2008). Ces deux polysaccharides sont similaires du point de vue de leur structure et leurs fonctionnalités. La chitine entre dans la composition de la cuticule des arthropodes et de certains mollusques (les céphalopodes), dans la paroi de certains microorganismes tels que les micro-algues et les moisissures. Les teneurs en chitine varient d'une espèce à l'autre. Le tableau I.2 montre les écarts qui existent selon les ressources disponibles pour produire la chitine.

Source	Teneur en chitine (en % mat sec)	Source	Teneur en chitine (en % mat sec)
Arthropodes	2 à 72	Crabes <i>Chionoecetes opilio</i>	26,6
Mollusques	6 à 40	Crevettes <i>Pandallus borealis</i>	17,0
Ponophores	33	Crevettes <i>Cangron cangron</i>	33
Cnidaires (capsules œufs)	3 à 30	Crevettes <i>Penaeus monodon</i>	3 à 30
Annélides	0,2 à 38	Ecrevisses <i>Procambarus darkia</i>	0,2 à 38
Brachiopodes	4 à 29	Bouquet	4 à 29
Champignons	2,9 à 20,1	Plume de calmar	2,9 à 20,1
Algues/ Lichen	Faible	Krill <i>Euphasia superba</i>	Faible

Tab.I.2 : Teneur en chitine par espèces (Mathur et Narang, 1990 ; Shahidi, 2002)

La production naturelle de chitine est estimée à plus d'un milliard de tonnes par an, jusqu'à 2,3 milliard de tonnes par an selon Jeuniaux (1991). 1 328 Mt proviennent de ressources marines (Cauchie, 2000), dont 29,9 Mt des crustacés, 1,4 Mt des mollusques et 0,7 Mt des calmars (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003).

Les ressources pour la production de chitine

Les sources privilégiées pour la production de chitine sont les coproduits de crustacés, en particulier les crevettes et les crabes. Cependant, le choix de la matière première est lié à l'activité locale. Certaines zones géographiques privilégient d'autres ressources, telles que les krills ou les bouquets. Les plumes de calmar sont parfois exploitées pour extraire de la chitine β . Cette structure est différente de la chitine α extraite des crustacés (Cf. section III). Leurs propriétés s'adressent à des applications technologiques spécifiques (Cf. section V). Des études ont également été menées sur la chitine α des éponges telles que *Verongula gigantea* et sur la chitine β de tubes digestifs de vers telles que *Riftia pachyptila* (Ehrlich et al. 2007).

La biomasse des microorganismes constitue une quantité de chitine abondante. Parmi eux, on peut citer les levures, les moisissures, certains ciliates, les algues appartenant aux chrysophytes et certaines bactéries dont les streptomycètes (Kim, 2010). L'avantage d'une telle production repose sur la maîtrise de la culture des microorganismes. La production de chitine peut être complémentaire à la production d'acide citrique de mycelium d'*Aspergillus niger* (Cai et al. 2006). Une entreprise belge, Kitozyme, née en décembre 2000, propose des dérivés de chitine-glucanes (complexe de chitine ramifié avec des unités de glucanes) obtenus à partir de paroi d'*Aspergillus Niger* (Fig.I.7).



Fig.I.7 : Procédé de fabrication de chitine-glucane par Kitozyme

Le rendement en chitine varie en fonction de l'espèce entre 9 à 35 % par rapport à la biomasse séchée. Le chitosan peut également être produit à partir de moisissures telles que *Rhizopus* et *Mucor* (Nadarajah et al. 2001).

L'ouvrage de Kim (2010) inventorie les avantages et les inconvénients des productions à partir des microorganismes. La maîtrise et la rapidité de leur croissance constituent les principaux avantages. Cependant le rendement en chitine est seulement de 8,5 à 19,6 % et celui en chitosan de 1 à 4 % par rapport au poids sec de la biomasse.

D'autres ressources terrestres ont également été explorées. Des études se sont intéressées à la production de chitine à partir de champignons (Zhang et al. 2000 ; Wu et al. 2004 ; Yen et Mau 2007), de vers à soie et d'abeilles (Nemtsev et al. 2004 ; Paulino et al. 2006). Les larves de vers sont composées de 24 % de chitine et les tonnages disponibles liés à l'industrie de la soie, plusieurs milliers de tonnes par an, justifieraient leurs exploitations (Zhang et al. 2000). De même, les abeilles exploitées pour la production de miel ont été proposées comme ressource pour l'extraction de chitine en Russie (Nemtev et al. 2004).

Enfin, des fermes ou des cultures sur milieux synthétiques ont été élaborées pour différentes espèces telles que *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Armillaria mellea* et *Pleurotus ostreatus* (Pochanavanich et Suntornsuk, 2002 ; Yen et Mau, 2007, Di Mario et al. 2008). Le rendement en chitine atteint 8,5 à 16,9 % et celui en chitosan entre 1 et 4 % par rapport à la biomasse sèche.

II. Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés

La chitine est naturelle, non-toxique, biodégradable et versatile. Son utilisation repose principalement sur sa capacité à former des matrices et ses activités biologiques intéressantes (Goycoolea et al. 1999).

Le caractère poly-cationique de très forte densité de charge du chitosan est souvent à l'origine de ses propriétés. En effet, il favorise la formation de complexes poly-électrolytes et ainsi la capacité à former des matrices (Shahidi, 1999). De plus, les dérivés de la chitine possèdent des activités biologiques comme hypo-cholestérolémique, antioxydant, anti-tumoral, antimicrobien, anti-hypertensive, antidiabétique et favorisant le système immunitaire (Kim, 2010). Ces domaines d'application vont être détaillés ci-dessous, par ordre croissant de grade technologique.

II.1. Les applications dans le domaine agricole

La chitine sert de substrat aux microorganismes producteurs de chitinase et d'anthraquinone par *Morinda citrifolia* par exemple (Dornenburg et Knorr, 1994). De plus, la chitine et ses dérivés jouent un rôle d'éliciteur sur les plantes. Il consiste à favoriser la production de métabolites secondaires qui renforcent les défenses immunitaires. Les dérivés de chitine stimulent par exemple la production de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la tyrosine ammonia-lyase (TAL), qui interviennent dans la synthèse de composés du système de résistance contre les pathogènes (Khan et al. 2003 ; Kim et al. 2005). Par conséquent, de meilleurs rendements de germination et de récolte sont obtenus (Crini et al. 2009 ; Rabea et al. 2003). Enfin, les produits chitineux apportent de l'azote ($\approx 7\%$) lorsqu'ils se décomposent, contribuant à l'enrichissement du sol et de la plante.

II.2. Les applications dans le domaine du traitement de l'eau

Des réductions de 70 à 98 % de la teneur en MES (matière en suspension, responsable de la turbidité) et de 55 à 80 % la demande chimique en oxygène (DCO) ont été observées pour le traitement des eaux usées (Jun et al. 1994) en utilisant du chitosan comme flocculant.

Du fait de leur forte densité de charge, les dérivés de chitine sont capables d'interagir avec les MES, les microorganismes et les ions métalliques (Taboada, 2003 ; Cardenas, 1876). Cette propriété est utilisée pour piéger les composés dangereux, pour les éliminer ou les doser (Camci-Unal et Pohl, 2010 ; Skorik et al. 2010). Guibal et al. (1994) ont étudié l'impact des caractéristiques des dérivés du chitosan et de leur environnement (lumière, gaz) sur leur capacité d'adsorption avec les ions uranyle. Le chitosan est également employé pour recycler les effluents de l'industrie textile en retenant des pigments (Yap et al. 2008).

Le chitosan peut être utilisé de plusieurs façons, la principale étant comme flocculant (Crini, 2009). Les colloïdes en suspension, les métaux lourds, les colorants des eaux de teintureries (Hsien et Rorrer, 1995) ou encore les molécules aromatiques et phénoliques (No et Meyers, 2000 ; Krajewska, 2005) s'agglomèrent avec le chitosan et les floccs sont retenus par filtration. Les floccs de chitosan réduisent de 50 % les MES (Rhee et al. 1998). Un autre mode d'action consiste à intégrer le chitosan directement dans la composition des membranes de filtration.

L'encapsulation d'enzyme par des matrices chitineuses est une piste étudiée pour le traitement de l'eau. Miao et al. (2000) ont montré la capacité du chitosan associé à la glutaraldéhyde à immobiliser la peroxydase extraite de raifort. Cette enzyme est employée pour éliminer les phénols des effluents de raffineries (Lu et al. 2010).

II.3. Les films de chitine/ chitosan

Les films de chitine et de chitosan s'obtiennent par leur dissolution dans une solution acide. La teneur en humidité du polysaccharide doit être faible pour réussir le film.

Du point de vue de leurs caractéristiques mécaniques, les films de chitine ne peuvent pas subir

d'élongation. Ceux à base de chitosan peuvent être étirés deux fois seulement. Ces propriétés mécaniques peuvent être améliorées par modification du chitosan (par ramification) ou par des ajustements de formulation. Par exemple, le chitosan-poly(vinyl-alcool) présente une meilleure résistance mécanique, stabilité et capacité d'élongation (Nakano, 2007).

Les produits cosmétiques

Beaucoup d'applications dans le domaine cosmétique reposent sur ces propriétés filmogènes. Des principes actifs peuvent être piégés dans des films ou des billes de chitosan. Ces principes actifs sont libérés au contact de la peau par l'effet de la diminution du pH. Les produits le plus couramment rencontrés sont des soins pour la peau, contre l'acné et pour les cheveux, notamment pour leur souplesse. Cette application repose sur les propriétés électrostatiques du chitosan (Rinaudo, 2006)

II.4. Les applications dans les industries alimentaires et diététiques

Plusieurs propriétés de la chitine ou de ses dérivés sont exploitées dans le domaine de l'agroalimentaire. Elles sont résumées dans le tableau I.3 :

Applications	Rôle
Préservation de la qualité des aliments	Antimicrobien Antioxydant
Films comestibles	
Additif alimentaire	Structurant Texturant, émulsifiant Ajoute arôme et couleur
Nutraceutique (compléments nutritifs)	Fibres Hypocholestérolémiant Contre l'intolérance au lactose Réduction de l'absorption des lipides
Recyclage des effluents	

Tab.I.3 : Utilisations de la chitine/ chitosan en agroalimentaire (Crini et al. 2009)

Les films alimentaires à base de dérivés de chitine sont à la fois une barrière physique et biologique contre les flores d'altération et les contaminations extérieures. Le chitosan serait plus efficace que les CHOS dans ce domaine, cependant les études ne sont pas unanimes. Tsai et al. (2004) montrent que le chitosan a un effet inhibiteur sur des pathogènes tels que *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica serovar Typhi*. À l'inverse, Kittur et al. (2005) et Kumar et al. (2005) ont montré que les CHOS étaient plus actifs. Lin et al. (2009) expliquent cette contradiction par le rôle dominant du degré d'acétylation par rapport à celui du degré de polymérisation. Ceci illustre bien à quel point les caractéristiques des dérivés de la chitine influent sur leurs propriétés.

Ces films alimentaires sont également antioxydants (Jeon et al. 2002). Kim et Thomas (2007) ont montré un résultat positif contre l'oxydation des lipides. Cette propriété est liée à la présence de deux groupes hydroxyles, en C-3 et C-6 (Cf. Fig.1). Ils attirent fortement les atomes d'hydrogène en les détournant des lipides (Je et al. 2004 ; Park et al. 2004). Il est

possible de réaliser des films alimentaires comestibles grâce au chitosan (De Moura et al. 2009 ; Cardenas et al. 2008).

Le chitosan et la glucosamine sont commercialisés comme compléments alimentaires. Les propriétés revendiquées reposent sur leur pouvoir antioxydant et leur capacité à faire perdre du poids. Le chitosan agirait comme film intestinal et comme fibre. Il inhiberait l'absorption des lipides et des sucres (Ylitalo et al. 2002), ou activerait directement le déstockage des lipides (Helgason, 2008). Les oligomères du chitosan semblent également prévenir les risques de diabète (Kumar et Tharanathan, 2004).

Les CHOS seraient également intéressants comme prébiotiques. Des résultats prometteurs ont été obtenus par Pan et al. (2009) avec des chitoooligosaccharides de 90 % de DD et de 3 à 6 DP.

Les utilisations comme auxiliaires technologiques

Du point de vue technique, le chitosan constitue un agent de clarification, par exemple pour l'industrie du vin (Chatterjee et al. 2004). Il permet d'éviter l'emploi du collagène, qui suscite la crainte des consommateurs depuis la crise de Creutzfeld-Jacob. Une réduction jusqu'à 95 % de la turbidité a été observée après utilisation de la chitine-glucane (Kim, 2010). De plus, le rôle antioxydant des dérivés de la chitine est exploité pour stabiliser les polyphénols du vin, et ainsi préserver sa couleur et ses arômes. Ils sont employés pour capter les métaux lourds par bio-adsorption, tels que le Cadmium, le Fer et le Plomb (Bornet et Teissedre, 2008). D'autres applications existent, telles que l'utilisation du chitosan pour recouvrir des fruits et légumes après leur récolte ou lors du procédé de fabrication du café (Scheruhn, 1999).

Les limites et les risques d'allergies

Des cas d'allergies ont été rapportés. Les procédés de fabrication et le degré de purification de la chitine peuvent être mis en cause puisque les allergènes incriminés seraient des agents chimiques tels que les métabisulfites, des amines biogènes ou des résidus protéiques tels que la trompomyosine (Lopata, 2010). La chitine déclenche également des réactions immunitaires qui peuvent aboutir à des réactions allergiques (Reese et al. 2007 ; Kim, 2012). Néanmoins, certains auteurs, dont Muzzareli (2010), revendiquent l'innocuité des compléments à base de dérivés de la chitine. De plus, le rôle du chitosan contre les inflammations liées aux réactions allergiques et à l'asthme a été décrit. L'explication de ces deux phénomènes antagonistes dépend de la taille du polymère (Brinchmann et al. 2011).

La consommation de chitosan doit également être soumise à des précautions vis-à-vis du calcium. Liao et al. (2007) ont montré qu'il limitait l'absorption du calcium tandis que les CHOS favoriseraient le phénomène inverse, et donc renforceraient les os (Jung et al. 2006).

II.5. Les applications dans le domaine médical

L'activité antimicrobienne

Le chitosan est antibactérien et antifongique (Hirano et Horiuchi, 1989 ; Allan et Hadwiger,

1979). Le mécanisme d'action de l'effet anti-microbiologique serait lié à la charge positive du C-2 (Cf. Fig.1). Cette activité serait favorisée lorsque la solubilité augmente (Chen et al. 1998). Le mode d'action du chitosan repose sur son interaction avec les membranes des cellules microbiennes (Shahidi et al. 1999). Les bactéries Gram-négatifs, telles qu'*E. coli*, paraissent particulièrement concernées (Chung et al, 2004). Cette activité semble être favorisée par des degrés de désacétylation élevés.

L'activité cicatrisante

Le rôle du chitosan est avéré dans la réparation tissulaire de l'épiderme (Howling et al. 2001) et la cicatrisation (Lahiji et al. 2000). De ce fait, le chitosan est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages (Ribeiro, 2009). Par exemple, un mélange de chitosan et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes, le HemCon® Bandage. Le degré de désacétylation augmentant, les performances de cicatrisation sont améliorées (Minagawa et al. 2007).

L'activité de chitoooligosaccharides

Les chitoooligosaccharides (CHOS) sont caractérisés par leur très faible longueur de chaîne, homogène ou hétérogène, d'unité de N-acétylglucosamine ou glucosamine. Selon Zhang et al. (1999), leur DP est compris entre 3 et 10, alors que celui de la chitine peut atteindre 5 000. L'engouement récent pour les CHOS s'explique par leurs propriétés intéressantes pour le domaine médical (Aam, 2010). Depuis les années 1970, leurs activités anti-tumorales et sur la réduction des métastases ont été mises en évidence (Muzzarelli, 1977 ; Suzuki et al. 1986 ; Nam et al. 2007 ; Shen et al. 2009). L'action s'appliquerait sur le contrôle de la croissance des vaisseaux sanguins (Prashanth et al. 2005 ; Wu et al. 2008). Les CHOS seraient également reconnus comme anti-inflammatoires en cas d'asthme (Kim, 2010) et comme anti-ulcère (Ito, 2000). Ils sont aussi connus pour favoriser la régénération osseuse (Klokkevold et al. 1996 ; Park et al. 2008 ; Ratanavaraporn et al. 2009) et la minéralisation du tissu osseux (Jung et al. 2006 ; Kim et al. 2005). Ils sont également utilisés comme vecteurs de gènes (Jiang et al. 2008 ; Kumar et al. 2004 ; MacLaughlin et al. 1998) et comme inhibiteurs de la malaria (Tsai et al. 2001 ; Takeo et al. 2009 ; Langer et al. 2001). Enfin, la glucosamine est largement utilisée pour réduire les douleurs liées à l'inflammation des articulations (Crini et al. 2009).

Le rôle de support matériel

L'intérêt pour les nanofibres et nanoparticules à base de chitosan s'accroît en médecine. À base de dérivés tels que la chitine carboxyméthylée et le poly(vinyl alcool) ou associés à des complexes, des matrices pour la bio-ingénierie sont obtenues. Elles peuvent servir pour la diffusion contrôlée et ciblée de principes actifs, et pour la régénération osseuse, de la peau, du foie et de la prostate (Jayakumar et al. 2011). Le chitosan permet une libération et une diffusion progressive et contrôlée lorsqu'il est impliqué dans l'encapsulation de molécules actives (Thanou et Junginger, 2005 ; Kumar et al. 2004 ; Agnihotri et al. 2004 ; Berger et al. 2004 ; Peniche et al. 2003).

Les applications en soin dentaire ou vétérinaire

Le chitosan intègre des pansements appliqués sur des lésions dues aux infections de la dent. Il

constitue un bio-matériel inoffensif, anti-inflammatoire et antimicrobien (Berthold et al. 1996). Des pâtes à mâcher à base de chitosan et CHOS ont également été étudiées, pour ôter les débris alimentaires ingérés. La salive libère les chito-oligomères, activant ainsi leur rôle anti-carie (Hayashi et al. 2007).

Le chitosan est utilisé par les vétérinaires comme moyen d'administration, tel que les sprays (application par douche), implant, bain, dispositif intra-mammaires, intra-rumen et intra-utérin. Certains dérivés de la chitine sont indiqués pour favoriser la croissance et stimuler les défenses immunitaires (Kim, 2010 ; Senel et McClure, 2004).

II.6. Autres applications

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices à base de chitosan s'étend aujourd'hui à tous les domaines (Kim, 2010). Les dérivés de chitine peuvent intégrer des électrodes, des capteurs, des phases stationnaires de colonne de chromatographie, des membranes d'osmose inverse et de dialyse. Dans l'industrie du papier et de la photographie, on utilise le chitosan pour obtenir une meilleure surface et pour résister à l'humidité. Les feuilles enduites de chitosan renforcent les propriétés morphologiques, mécaniques, optiques, de vieillissement et offrent une meilleure qualité d'impression (Kim, 2010). Dans le domaine textile, des principes actifs peuvent être encapsulés dans du chitosan et imprégnés dans les tissus pour fabriquer des vêtements dits « intelligents ». Les principes actifs se diffusent progressivement sur la peau à mesure que le vêtement est porté (Crini, 2009). Le chitosan est également capable d'améliorer la force et la rigidité d'un tissu (Kim, 2010). Enfin, la chitine, comme substrat nutritif, favorise la croissance de microorganismes chitinolytiques. Cette propriété est exploitée pour améliorer des composts (De Jin et al. 2005) et comme méthode d'identification de ces microorganismes (Gomez-Ramirez et al. 2004).

II.7. Évolution des volumes de ventes par domaine d'application

La figure I.8 illustre, l'évolution des secteurs d'application du chitosan de 2001 à 2006.

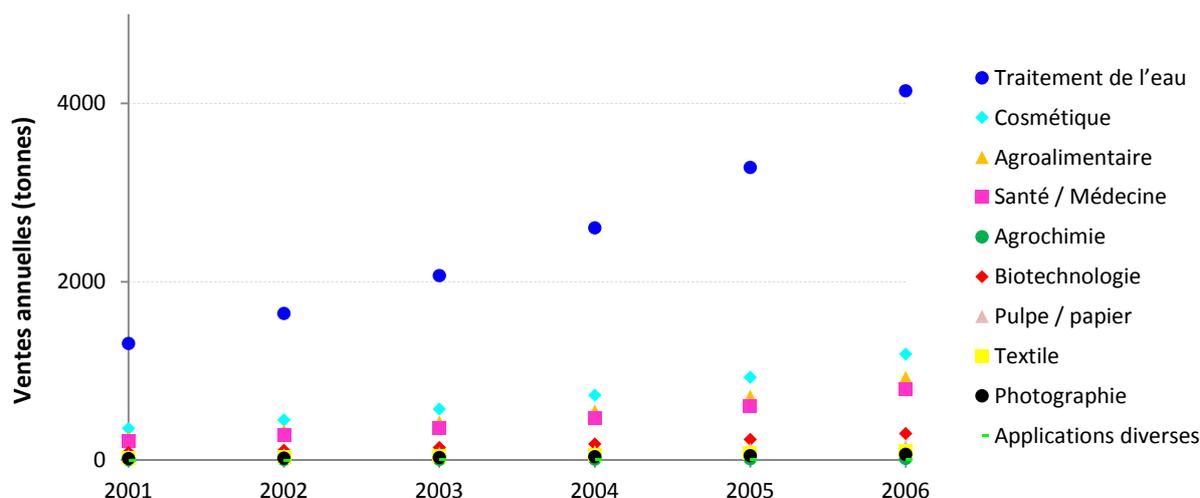


Fig.I.8 : Évolution des domaines d'application pour lesquels le chitosan est employé (D'après GIA, 2010)

Les applications du chitosan sont largement dominées par le secteur du traitement de l'eau,

qui atteint plus de 4 000 tonnes consommées en 2006. Ce secteur est suivi par celui de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de l'agrochimie. Les autres secteurs tels que la biotechnologie, la papèterie, le textile et la photographie représentent de faibles volumes de ventes. Les prévisions évolueraient peu à l'horizon 2015 (GIA, 2010).

Le premier pays consommateur de chitosan, notamment pour le secteur du traitement de l'eau est le Japon, avec près de 3 700 t en 2006. Les pays occidentalisés, tels que les États-Unis, consomment davantage le chitosan dans les domaines de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de la biotechnologie. La zone Asie-Pacifique est leader dans la consommation du chitosan en agriculture/agrochimie (Tab.I.4).

Domaine d'application	USA	Europe	Japon	Asie-Pacifique	Canada	Autres	Total
Traitement de l'eau	450,3	368,6	2 900,8	245,8	74,9	101,0	4141,4
Cosmétique	535,8	173,6	209,6	136,4	54,2	79,8	1189,4
Agroalimentaire	352,0	209,6	197,2	72,2	67,8	33,1	931,9
Santé/Médecine	306,5	84,9	156,2	200,5	31,1	13,9	793,1
Agrochimie	125,6	73,4	89,0	285,5	29,2	20,0	622,7
Biotechnologie	131,2	37,1	57,5	45,2	15,8	12,1	298,9
Pulpe/papier	39,1	28,9	36,1	29,6	11,2	6,8	151,7
Textile	23,47	17,8	25,5	19,9	6,3	4,3	97,3
Photographie	13,04	9,1	29,7	8,9	2,9	1,7	65,3
Applications diverses	28,89	18,9	54,1	19,1	8,3	4,1	133,4
TOTAL	2005,9	1021,9	3755,7	1063,1	301,7	276,8	8425,1

Tab.I.4 : Répartition des applications du chitosan, en tonnes, en 2006 (GIA, 2010)

II.8. Conclusions sur les caractéristiques de la chitine et ses applications

Les applications décrites ci-dessus soulignent le lien entre les caractéristiques structurales des dérivés de la chitine avec leurs domaines d'application. En particulier, le degré d'acétylation (Bajaj et al. 2011 ; Kurmirska et al. 2010) et le poids moléculaire sont déterminants. Sorlier et al. (2001, 2003) ont étudié l'impact du DA sur les propriétés électrostatiques de la chitine et du chitosan. Aranaz (2009) dresse un bilan assez complet des propriétés de la chitine et du chitosan en fonction de leurs caractéristiques (Annexe B).

III. Structure de la matrice chitineuse chez les crustacés

III.1. La biosynthèse de la chitine

La biosynthèse de la chitine fait intervenir des enzymes nommées chitine-synthases (CS), de la famille des glycotransférases. Elles catalysent l'association de deux monomères de N-acétylglucosamines. Elles requièrent de l'UDP-N-acétylglucosamine comme substrat et des cations divalents (Khoushab et al. 2010). La biosynthèse est divisée en trois étapes distinctes. Au cours de la première étape, l'enzyme se place le long de la membrane cytoplasmique et oriente convenablement le polymère vis-à-vis de son site actif. La seconde étape est la

translocation du polymère à travers la membrane. Il est alors libéré dans l'espace extracellulaire. La dernière étape permet l'assemblage de plusieurs polymères en microfibrilles cristallines.

III.2. L'organisation de la cuticule des crustacés

Les cuticules de crustacés sont constituées de chitine, protéines et minéraux (essentiellement le carbonate de calcium). Les proportions sont variables selon les espèces. Le tableau I.5 (Kurita, 2006) illustre les quantités de chitine et de carbonate que l'on peut trouver selon la source. Les ressources traditionnellement exploitées pour extraire la chitine, sont composées de 15 à 40 % de chitine, 20 à 40 % de protéines et 20 à 50 % de carbonate de calcium (en poids sec). Pour une espèce donnée, la répartition est plus stable (Bouchon, 1995).

Source	Chitine (%)	CaCO ₃ (%)
Cuticule de crabe	15-30	40-50
Cuticule de crevette	30-40	20-30
Cuticule de bouquet	20-30	20-25
Plume de calmar	20-40	Négligeable
Coquille d'huître/ palourde	3-6	85-90
Cuticule d'insectes	5-25	Négligeable
Paroi de cellule fongique	10-25	Négligeable

Tab.I.5 : Quantités de chitine et de carbonate de calcium (Kurita, 2006)

Les trois constituants majoritaires, chitine, protéines et CaCO₃, forment un réseau dense. La chitine y joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement (Roer et Dillaman, 1984). Elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur, les agressions chimiques et physiques. Elle est également le site d'attachement des muscles et le lieu d'échange et de transport de substances, notamment l'adsorption de composés anioniques. Enfin, elle joue un rôle dans le système immunitaire (Tokura et Tamura, 2007).

L'origine du nom de la chitine est issue du grec « khiton » qui signifie « tunique » car elle participe à l'enveloppe extérieure de nombreux organismes depuis des milliers d'années. À ce titre, la chitine ou ses unités osidiques servent à étudier les fossiles et la phylogénie (Shen et Jacobs, 1998). Par exemple, Furuhashi a utilisé la chitine pour déterminer l'ancêtre commun des mollusques (Furuhashi, 2009).

La chitine forme, avec les protéines, des microfibrilles cristallines. L'élasticité de la carapace dépend du degré de liaison entre la chitine et les protéines, et de leur répartition dans la matrice. Ces protéines peuvent être des arthropodines² (responsables de la rigidité), des sclérotines³ (rôle dans la pigmentation) ou des résilines⁴ (attribuées à l'élasticité des cuticules et permet les mouvements).

² Protéine associée à la chitine dans l'endocuticule des arthropodes, elle se caractérise par une forte rigidité

³ Protéine tannée entrant dans la composition de la cuticule des Arthropodes

⁴ Famille des protéines élastiques (inclue l'élastine, le gluten). Chez les insectes elles participent à la capacité de sauter ou tout autre mouvement rapide ou répétitif qui nécessite du stockage d'énergie

L'un des premiers à avoir décrit précisément la structure de la cuticule des crustacés est Yves Bouligand (1972), le motif de la structure porte donc son nom. Elle s'organise en plusieurs étages (Fig.I.9), on peut distinguer sept niveaux hiérarchiques qui vont être décrits ci-dessous.

Au premier niveau se trouve la structure moléculaire de la chaîne linéaire polysaccharidique de la chitine. Au second, on distingue les trois formes d'arrangement géométrique de ces chaînes, soit α , β ou γ (Cf. IV.1). Au troisième niveau, 18 à 25 molécules de chitine s'assemblent en unités cristallines, étroites et longues, enveloppées de protéines. Ces nanofibres ainsi obtenues mesurent 2 à 5 nm de diamètre et environ 300 nm de longueur. Elles s'assemblent ensuite en fibrilles plus importantes, de l'ordre de 50 à 300 nm de diamètre. L'espace disponible entre les fibrilles est comblé par les protéines et des minéraux, principalement le carbonate de calcium, soit sous forme cristalline (calcite), soit amorphe (Vincent, 2002 ; Raabe et al. 2005).

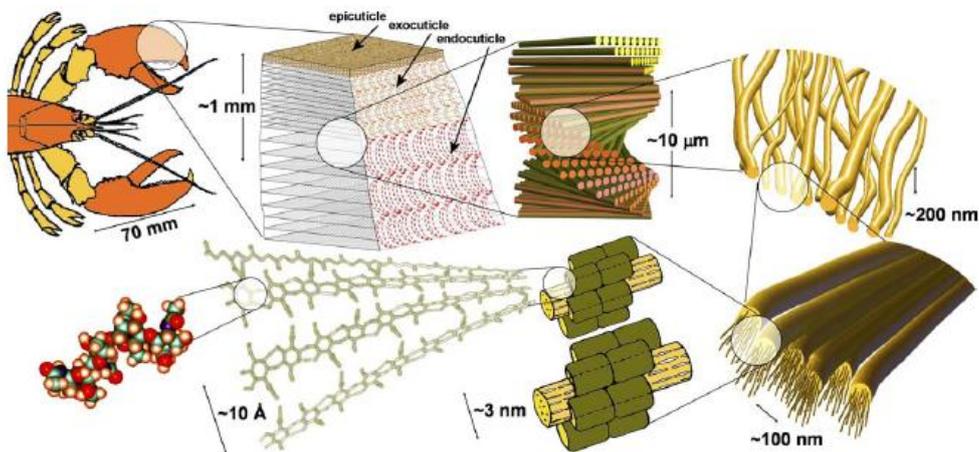


Fig.I.9 : Niveaux hiérarchiques dans l'organisation de la cuticule de crabe *H. americanus* (Raabe, 2005).

Au niveau suivant, les microfibrilles s'organisent en plans. Enfin les plans se superposent, chacun étant tourné d'un degré de rotation constant par rapport à l'axe normal. On obtient une structure hélicoïdale (Fig.I.10). Cette organisation particulière est appelée « motifs de Bouligand » (Bouligand, 1972 ; Giraud-Guille, 1984).

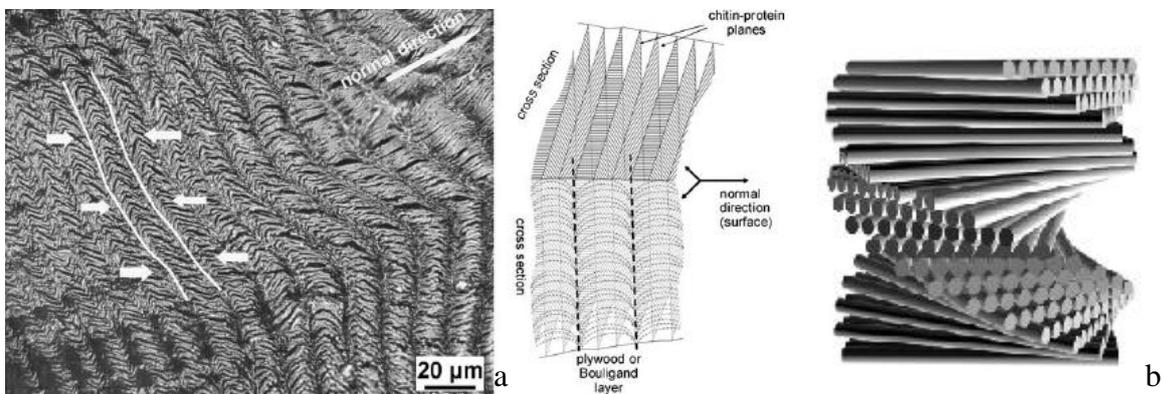


Fig.I.10: (a) Motifs de Bouligand, CT de cuticule de homard en MEB, Raabe, 2006 ; (b) représentations schématiques de l'empilement des fibres, Pillai et al. 2009

L'observation des plans superposés de chitine-protéines permet de distinguer des perforations perpendiculaires qui constituent des pores traversés par des canaux. À cause de son aspect,

cette structure est appelée « nids d'abeilles » (Fig.I.11). Les canaux sont formés de fibres de chitine-protéines minéralisées et ils sont flexibles (Fabritius et al. 2009).

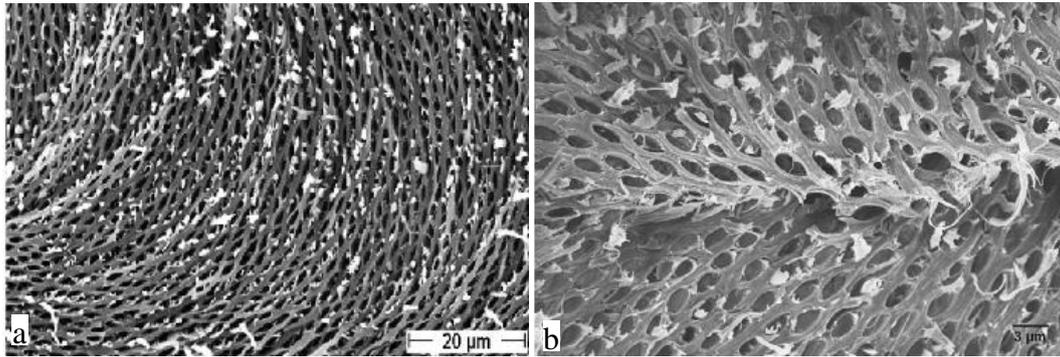


Fig.I.11 : Structure en « nid d'abeilles » de cuticule de homard en CT par MEB (a) Pillai, 2009 (b) Raabe, 2006

D'après l'étude de Raabe (2005), on peut distinguer deux parties dans l'organisation de la cuticule. L'exo-cuticule est caractérisée par une forte rigidité (8,5-9,5 GPa) et une forte résistance (130 à 270 MPa). L'endo-cuticule est plus désorganisée, moins rigide (3-4,5 GPa) et moins résistante (30-55 MPa).

La minéralisation a été étudiée par Giraud-Guille et al. (2004) à partir de la cuticule du crabe. Les cristaux de calcite sont produits à la surface de l'épicuticule par des enzymes pendant la mue. La production s'étend en surface tels des disques plats, puis s'infiltré verticalement et horizontalement, partout où l'espace est libre entre les cellules épidermiques.

Ces travaux suggèrent que la minéralisation est initiée par du carbonate de calcium analogue à du cristal liquide (phase dite cholestérique). Les molécules évolueraient vers une phase nématique chirale (orientation dirigée et arrangement hélicoïdal) en fonction de la teneur en chitine dans le milieu. Ceci conduit à la minéralisation progressive, la formation de nouvelles liaisons entre molécules et l'augmentation progressive de la rigidité des carapaces. La figure I.12 montre la structure de la cuticule normale et décalcifiée.

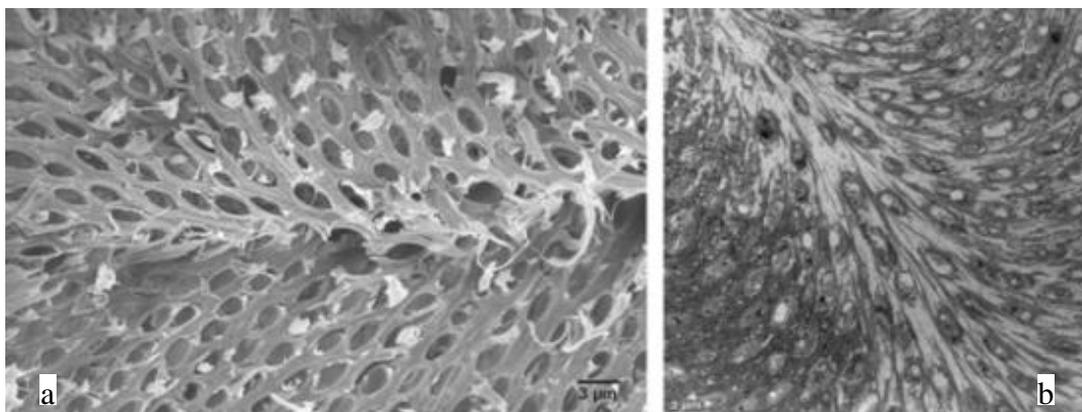


Fig.I.12 : Structure de la cuticule normale (a) et décalcifiée (b) par MEB (Raabe, 2005)

L'ensemble du dispositif fibrillaire torsadé confère à la cuticule une grande cohésion rigide. Les microfibrilles et les plans sont stabilisés par des liaisons hydrogènes ou covalentes (Pillai et al. 2009; Rinaudo, 2008). Parmi ces liaisons, l'une des plus fortes, $-C-O-NH-$, permet de

maintenir les chaînes primaires de chitine à une distance de 0,47 nm (Pillai et al. 2009).

La chitine et les protéines sont liées indirectement (Neville et al. 1976). Leurs liaisons seraient similaires à celles qui s'opèrent entre la cellulose et les protéines (Tormo et al. 1996). Ces liaisons reposent sur des noyaux aromatiques fixés d'un côté au squelette carboné du polysaccharide et de l'autre à la protéine. Les noyaux aromatiques seraient liés aux carbones C-1 et C-2 (Cf. Fig.1, p3) des N-acétylglucosamines de la chitine d'une part, à l'aspartate et à l'histidine des protéines d'autre part. Plus de 50 % des protéines seraient impliquées dans cette interaction (Diaz-Rojas et al. 2006). La présence de phénol-*o*-dihydrique a également été rapportée (Roberts, 1992). Cette molécule serait située entre les protéines afin de les protéger contre les chitinases et de la déshydratation.

La relation entre les protéines et la chitine a été étudiée par pyrolyse et chromatographie GC/MS par le biais de marqueurs (Stankiewicz et al. 1996). Un résidu d'histidyle et un groupe catéchol serviraient de lien pour relier la chitine et les protéines (Fig.I.13).

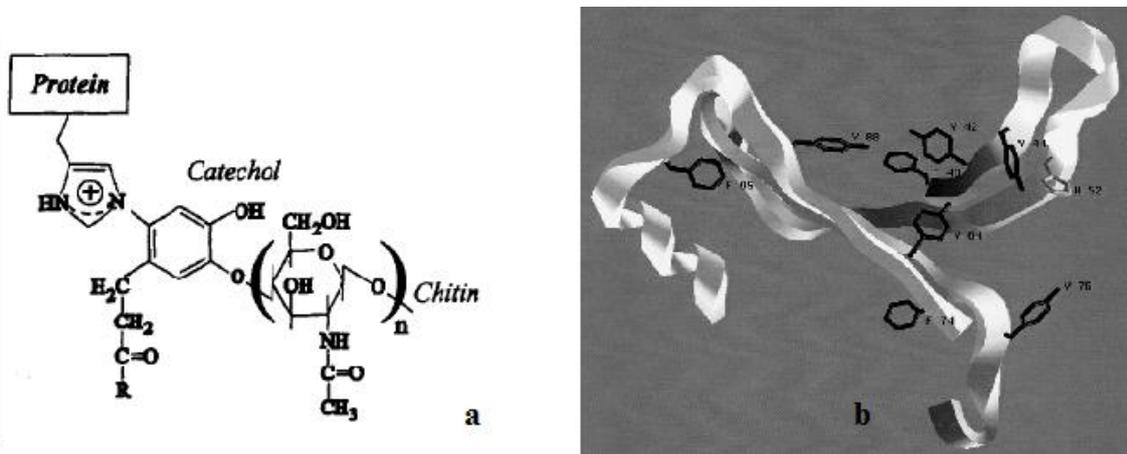


Fig.I.13: Proposition de structure entre chitine et protéines, a) Stankiewicz et al. 1996 b) Hamodrakas, 2002

Les protéines impliquées dans cette interaction présenteraient une surface plane, selon une configuration en feuillet- β (Iconomidou et al. 1999). D'un côté, les groupes aromatiques se lient à la chitine, de l'autre des liaisons entre protéines s'établissent (Hamodrakas, 2002). L'analyse d'arthropodes fossilisés a révélé une structure soutenue par un polymère minéral, dit géopolymère. Il est similaire au squelette carboné de céphalopodes récents sur lequel sont fixées des molécules aromatiques (Gupta et al. 2008).

Certains peptides présents dans les cuticules sont responsables de l'inhibition de la calcification (Inoue et al. 2004). L'activité repose sur une affinité du peptide avec les ions calcium, qui sont ainsi détournés. Des lipocalines⁵ sont également présentes dans la cuticule. Elles jouent un rôle dans le transport de substances et le maintien de la structure générale (Grzyb et al. 2006). Hackman et Goldberg (1978) ont mis en évidence l'influence du pH sur des liaisons non-covalentes entre les protéines et la chitine.

⁵ Protéines impliquées dans le transport de petites molécules hydrophobes (stéroïdes, sels biliaries, rétinoides...). Elles partagent des régions de séquences homologues et une architecture tertiaire commune

D'autres recherches se concentrent sur les gènes codant les protéines de cuticules (Willis et al. 2010). Des protéines sont précisément identifiées, référencées et ciblées pour une activité spécifique. Elles intéressent notamment le secteur médical (Khoushab, 2010). Parmi ces protéines, la tachycitine est reconnue pour son activité antifongique (Suetake et al. 2002).

IV. Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques de la chitine et ses dérivés

« Chitine » peut être considérée comme le terme générique pour les amino-polysaccharides composés d'unités de **N-acétyl-β-D-glucosamines (NacGlu ou A)**, à hauteur de 50 à 100 %, et de **D-glucosamines (Glu ou D)**, la fraction complémentaire. Les unités sont reliées entre elles par des liaisons β(1-4) et les groupements N-acétyles sont fixés au C-2 (Tokura et Tamura, 2007).

Une chitine parfaite posséderait un degré d'acétylation (DA) de 100 % tandis que le chitosan, son dérivé désacétylé idéal, aurait un DA de 0 % (ou un degré de désacétylation, DD, de 100 %) si la désacétylation était complète. Dans la nature, ces deux extrêmes n'existent pas, la forme la plus courante est une chitine de DA de 85-95 %, rarement moins. Le chitosan est obtenu par désacétylation de la chitine. La limite de DA entre chitine et chitosan varie selon les auteurs. On parle de chitosan à partir de 50 % de NacGlu selon Al Sagheer (2009), plus généralement le chitosan est défini comme étant la forme désacétylée à plus de 60-70 %. La figure I.14 représente les deux molécules.

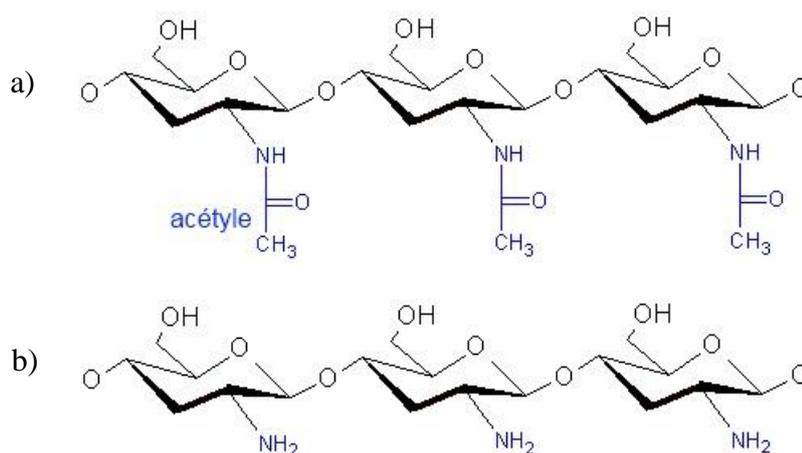


Fig.I.14 : Représentation idéale de la chitine (a) et son dérivé obtenu par désacétylation, le chitosan (b).

La stabilité thermique de la chitine est étudiée pour caractériser les différentes chitines et ses dérivés. Elle est évaluée par analyse thermogravimétrique (ATG) et se situe entre 370 °C et 600 °C (Romano et al. 2007). Lorsqu'elle est complexée dans la matrice des cuticules, la stabilité thermique est modifiée, influencée par les interactions avec les protéines et minéraux (Zhou, 2010). Une approche détaillée de cette technique sera présentée ultérieurement, au Chapitre 2. (Section III.5.2).

Les caractéristiques structurales de la chitine et de ses dérivés déterminent directement leurs propriétés et par conséquent leurs domaines d'application (Berth et Dautzenberg, 2002 ; Lamarque et al. 2004 ; De Alvarenga et al. 2010). Leurs propriétés sont principalement liées au degré de polymérisation (correspond à la longueur de la chaîne), au degré d'acétylation, à la répartition des groupes acétyles et à la cristallinité (Jaworska et al. 2003).

IV.1. La structure cristalline et l'indice de cristallinité

La présence des trois arrangements α , β et γ (Fig.I.15) varie selon le type de tissu. Elle est associée à un rôle physiologique particulier (Pillai et al. 2009). La chitine α est caractérisée par des chaînes antiparallèles. À l'inverse les chaînes de la chitine β sont disposées en parallèle. Le troisième allomorphe⁶, γ , est peu courant et alternerait les arrangements parallèles et antiparallèles (Rinaudo, 2008).

La chitine α est la plus courante, présente chez les Arthropodes, dont les crustacés, chez les fongiques et les levures. Elle est la forme la plus stable grâce aux liaisons hydrogènes et covalentes entre les chaînes. Les liaisons glycosidiques sont orientées selon une géométrie diaxiale, ce qui implique une position diagonale des motifs de N-acétylglucosamines. Ceci favorise l'association latérale de ponts hydrogènes entre chaînes et des groupes C=O aux groupes N-H (Rinaudo, 2006). Einbu (2007) note également des liaisons intramoléculaires entre le C-6 et le carbonyle, puis entre l'oxygène du cycle et le C-3 (Fig.1, p3). Par conséquent, la cristallinité de la chitine α est élevée.

Au contraire, la chitine β est moins stable, moins cristalline et plus rare. Elle est présente dans les plumes de calmar, dans les tubes produits par des vers de la famille des pogonophores⁷ et vestimentifères⁸, chez certaines algues et protozoaires (Rinaudo, 2006). En particulier, une forme très pure de la chitine β est synthétisée par la diatomée *Thalassiosira fluviatilis* (Herth, 1979). À cause de sa stabilité réduite, la chitine β est plus réactive que la chitine α , notamment avec les solvants (Shimojoh et al. 1998 ; Aranaz, 2010).

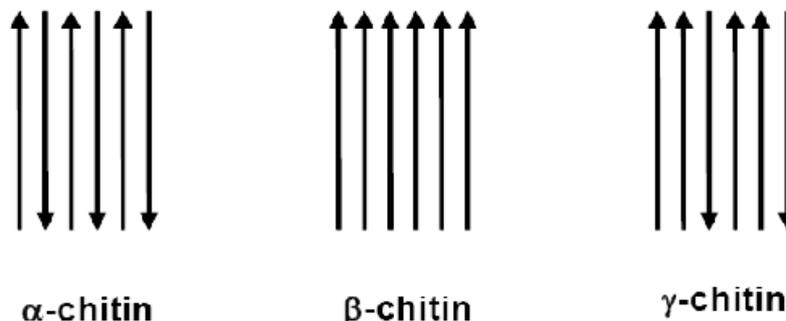


Fig.I.15: Arrangement des trois formes existantes de chitine : α , β et γ (Einbu 2007)

La distinction entre ces formes peut être réalisée par RMN, Rayons X ou spectrophotométrie

⁶ Formes différentes à partir d'une même unité de base

⁷ Vers cœlomés sédentaires vivant dans des tubes annelés sur les fonds marins

⁸ Vers marins vivant dans de grands tubes, n'ayant pas de système digestif, mais en symbiose avec des bactéries

IR (Sun et al. 2006).

L'organisation d'un solide est soit amorphe, soit cristalline, soit semi-cristalline. L'état cristallin est caractérisé par la répétition périodique d'un motif, lequel est placé dans une maille fictive. Cette méthode permet de déterminer les caractéristiques spatiales du motif et donc du cristal. La maille est généralement un parallélépipède défini par trois longueurs **a**, **b** et **c** et trois angles d'orientation α , β et γ (Fig.I.16). Ensuite, l'assemblage des motifs forme un réseau périodique monodirectionnel, bidirectionnel (plan 2D) ou tridirectionnel (espace 3D). Les points du réseau où sont situées les particules s'appellent des nœuds. Ils caractérisent également l'organisation cristalline.

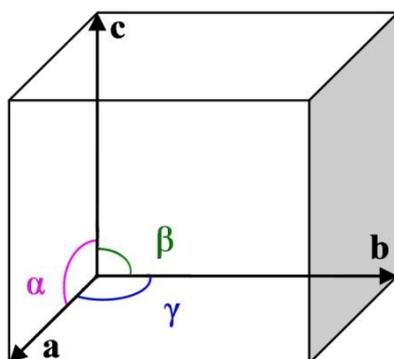


Fig.I.16: Maille cristalline

Okuyama (1997) a étudié l'organisation cristalline du chitosan, à partir de chitine de crabe désacétylée. Le motif cristallin présente une structure orthorhombique⁹, selon les dimensions $a = 8,9$, $b = 17,0$, c (axe de la chaîne) = $10,3 \text{ \AA}$, dans un espace de type $P2_12_12_1$. Takura et Tamura (2007) comparent la cristallinité de chitine α et β . La chitine α présente une structure orthorhombique de dimension $a = 4,7$, $b = 18,9$ et $c = 10,3 \text{ \AA}$ (Minke et Blakwell, 1978). Tandis que la chitine β est monoclinique, de dimension $a = 4,8$, $b = 9,3$ et $c = 10,4 \text{ \AA}$ et d'espace $P2_1$. Ils montrent également des modifications selon la teneur en eau dans les produits. Ces résultats illustrent les différences de cristallinité qui peuvent être rencontrées en fonction de l'origine de la chitine et du type de dérivé.

D'autres paramètres ont une influence sur la cristallinité, tous sont liés au procédé de fabrication. Les traitements acides et basiques prolongés ont tendance à réduire la cristallinité (Seoudi et Nada, 2007), ainsi que la désacétylation (Revol et Marchessault, 1993 ; Vikhoreva et al. 1999). De plus, la solubilité est directement liée à la cristallinité et à la teneur en glucosamines dans le produit (Cho et al. 2000). Cependant, il est possible de régénérer le système cristallin par un traitement basique adapté (Pillai et al. 2009). Lamarque et al. (2004) révèlent que l'augmentation de la cristallinité s'oppose à la désacétylation.

L'organisation microscopique des cristaux de chitine ou de chitosan est étudiée par diffraction aux rayons X. Le principe de son calcul sera détaillé au chapitre 2.III.3. Cette technique permet de décrire l'organisation cristalline et de mesurer l'indice de cristallinité d'un

⁹ Terme qualifiant un système cristallin qui est un prisme droit, et dont la base est en forme de losange

échantillon. Cet indice traduit la proportion de zones cristallines au sein d'une structure (Jaworska et al, 2003). Il est important de noter que les traitements acides éliminent les zones amorphes et par conséquent augmentent l'indice de cristallinité (Remol et Marchessault, 1993).

IV.2. Le degré de polymérisation

Les macromolécules de chitine possèdent un poids moléculaire important, généralement supérieur à 10^6 Da (1 à $2,5 \cdot 10^6$ Da selon Pacheco, 2009), soit plus de 3 000 à 5 000 unités répétitives, en fonction de la proportion de Glu¹⁰ et de NacGlu¹¹. Les poids moléculaires des chitosans sont souvent réduits au cours du procédé de désacétylation, cependant ils demeurent élevés, de l'ordre de 10^5 à $5 \cdot 10^3$ Da. Les exemples cités par la littérature varient. Fischer et al. (2004) utilisent du chitosan de 0,4 à $1 \cdot 10^5$ Da, désacétylé entre 70 et 95 %. No et al. (2003) évoquent des poids moléculaires de l'ordre de 10^6 Da tandis que Ito et al. (2000) situent la chitine au-delà de 10^6 Da, le chitosan entre 0,5 et $1 \cdot 10^6$ Da et ses oligomères entre 25 et 500 kDa. Kumar et Tharanathan (2004) délimitent le poids moléculaire des LMWC (low molecular weight chitosan) de 5 à 20 kDa. Notons que la taille des macromolécules est importante pour les applications tel que le médical (Cf. section II).

Les oligomères de chitine et de chitosan s'obtiennent par hydrolyse de la chaîne carbonée. Jung et al. (2007) obtiennent des chitobioses [(NacGlu)₂], chitotrioses [(NacGlu)₃], chitoheptoses [(NacGlu)₇] et chitooctoses [(NacGlu)₈]. Les traitements acides et la déprotéinisation enzymatique favorisent la dépolymérisation (Poirier et Charlet, 2002).

IV.3. La masse molaire et la polydispersité des longueurs de chaîne

Les polymères n'ont pas de masse molaire car la nature et le nombre de leurs unités varient. On parle de distribution de masse moléculaire moyenne en nombre (M_n), en poids (M_p) et viscosimétrique (M_v). Elles sont illustrées par la figure I.17. Cependant, par abus de langage le terme « masse molaire » est souvent utilisé.

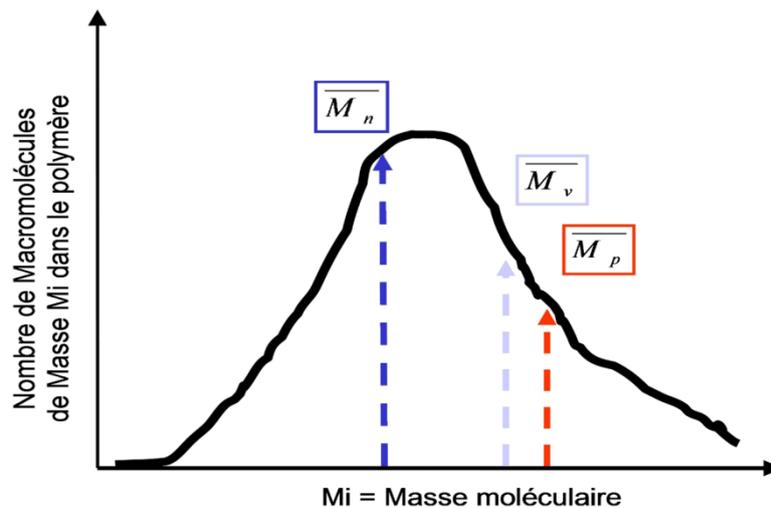


Fig.I.17 : Dispersion des masses moléculaires

¹⁰ **Glu** ou **D** : D-glucosamines, monosaccharide constitutif du chitosan pur

¹¹ **NacGlu** ou **A** : N-acétyl-β-D-glucosamines, monosaccharide constitutif de la chitine pure

Le rapport I_p entre M_p et M_n est appelé indice de polymolécularité. Plus celui-ci est élevé, plus la distribution est élevée.

$$I_p = \frac{\overline{M}_p}{M_n} \quad (\text{I.1})$$

Par définition, la masse molaire M_n est liée au degré de polymérisation moyen en nombre, DP_n , selon la relation suivante :

$$M_n = \overline{DP}_n \times m_0, \text{ avec } m_0 \text{ la masse molaire d'une unité} \quad (\text{I.2})$$

Les deux grandeurs traduisent la longueur moyenne des polymères. En pratique, on a recours à des techniques telles que la chromatographie d'exclusion stérique pour estimer la masse molaire moyenne en nombre. Cependant, cette technique serait très difficile à mettre en œuvre pour la chitine. On détermine donc plutôt la masse molaire viscosimétrique, d'après les travaux de Staudinger (1881-1965) sur la viscosité des solutions de polymères.

D'après l'équation de Mark-Houwink-Sakura (MHS), la viscosité intrinsèque est proportionnelle à M_v , lorsque la concentration des polymères dissous tend vers zéro. Or, la viscosité intrinsèque peut être mesurée à l'aide d'un viscosimètre à capillaire.

$$[\eta] = KM_v^a \text{ (MHS)} \quad (\text{I.3})$$

Les coefficients a et K de l'équation MHS dépendent du type de solvant, du polymère et de la température (Flory et Fox, 1996). Le coefficient a est relatif à la conformation de la molécule. Le polymère tend à être linéaire lorsque a tend vers 1. À l'inverse quand a décroît, la molécule tend vers une forme de pelote compacte. De plus, la valeur de a confirme le caractère linéaire de la chitine. Les coefficients a et K ont été calculés pour la chitine solubilisée dans le DMAc/LiCl (Poirier et Charlet, 2002 ; Rinaudo, 2006). Leur valeur et la méthode pour déterminer la masse molaire est décrite au chapitre 2 (section III.2).

Kasaai et al. (2000) ajoutent un facteur de correction q_{MHS} dans l'équation de Mark-Houwink-Sakurada pour tenir compte de l'impact de la polydispersité des chaînes. Pour la chitine comme pour le chitosan, la masse molaire moyenne et la polydispersité des longueurs de chaîne dépendent essentiellement des conditions du procédé de fabrication (Tsai et al. 2010). La polydispersité affecte indirectement les propriétés de la chitine et du chitosan, en atténuant celles liées à la masse molaire. Lorsque la polydispersité est étroite, son impact est minimal. Au contraire, si I_p est élevé, les propriétés liées à la masse molaire sont affectées. Par exemple, la capacité à former des capsules, des nanoparticules et des liaisons avec d'autres substances, sera différente (Tsai et al. 2010). Limiter la poly-dispersion favorise donc le contrôle des procédés d'applications. La polydispersité peut être réduite par un traitement mécanique tel que les ultrasons (Chen et al. 1997 ; Wu et al. 2008).

IV.4. La solubilité

La solubilité d'un polymère est liée aux interactions intra et inter moléculaire entre les chaînes (Ravindra et al. 1998). La densité de charge de la chitine implique son caractère hydrophobe. Par conséquent, elle n'est pas soluble dans les solvants classiques. Les acides concentrés, de

IV. Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques de la chitine

préférence à chaud, et certains solvants toxiques sont capables de solubiliser la chitine. Leur utilisation est dangereuse pour l'opérateur et dégradent la structure de la chitine et du chitosan (Hsiao et al. 2004). Le tableau I.6 dresse une liste non-exhaustive de ces solvants.

Chitine	Diméthylformamide/ 5% chlorure de lithium Diméthylacétamide/ 5% chlorure de lithium Hexafluoroisoacétone sesquihydrate Hexafluoroisopropanol
Chitosan	Acide formique/w, Acide acétique/w, Acide lactique/w, Acide glutamique/w, Acide dichloracétique Acides trichloroéthane, dichloroéthane

Tab.I.6 : Liste non-exhaustive des solvants de la chitine, (Shahidi, 2002 ; Kumar, 2004 ; Morris 2009)

Ceci constitue l'inconvénient majeur qui limite l'utilisation de la chitine et rend difficile sa caractérisation. Des recherches récentes portent sur le potentiel des liquides ioniques pour solubiliser la chitine d'une part, et former un film d'autre part (Wu et al. 2008 ; Kadokawa et al. 2011).

L'acide phosphorique (H_3PO_4) est un acide alimentaire également capable de solubiliser la chitine. Hein et al. (2007) l'utilisent pour la mise au point d'une méthode de détermination du DA. La chitine est dissoute à 55 °C, par H_3PO_4 à 0,5 M, dans un ratio w/v de 1 :200 et pendant 1 h. Wu et Zivanovic (2008) pratiquent la même technique sous des conditions plus fortes, à 60 °C et jusqu'à 3 h. L'inconvénient de cette méthode est la production d'ions glucofuranosyl oxazolinium (Vincendon et al. 1997), composés intermédiaires instables qui peuvent nuire à la mesure de DA par RMN (Einbu et al, 2007b).

Pour obtenir un équilibre entre la dégradation minimale et la solubilisation maximale de la chitine, le solvant privilégié est généralement le DMAc/LiCl. Un complexe se forme entre les ions Cl^- et les groupes protonés OH^- et $NHCOCH_3^-$ de la chitine. La formation de ce complexe « polyélectrolyte » s'accompagne de la rupture des liaisons hydrogènes qui stabilise la structure cristalline du polymère, favorisant sa solubilisation (Poirier et Charlet, 2002). La viscosité intrinsèque de la chitine solubilisée est alors déterminée pour estimer sa masse molaire moyenne en nombre.

La solubilisation du chitosan est davantage accessible par des solvants acides, à un pH < 6,5, correspondant au pKa du chitosan. La présence des groupements protonés NH_3^+ modifie la densité de charge de la molécule. Par conséquent, la solubilisation dépendra du DA, ainsi que de la nature du solvant. Le tableau I.6 donne également une liste non-exhaustive de solvants du chitosan. Généralement, les plus courants sont des mélanges à base d'acide acétique et d'acétate de sodium (Kasaai, 2007).

La masse molaire, la polydispersité et la solubilité de la chitine et ses dérivés ont un impact direct sur leur comportement rhéologique. Par exemple, la viscoélasticité et le volume molaire sont affectés. La concentration en polymère dans le solvant est également importante. Il existe une concentration critique, dite d'enchevêtrement ou de recouvrement, au-delà de laquelle les pelotes de macromolécules s'interpénètrent. Cette concentration dépend de la masse molaire

et du degré d'acétylation (Dong et al. 2002 ; Franca et al. 2008).

IV.5. Le degré d'acétylation et la répartition des groupes acétylés

Ce critère dépend exclusivement des conditions du procédé de fabrication du chitosan.

Le degré d'acétylation ou de désacétylation peut être déterminé par plusieurs techniques. Le choix de la méthode est dicté par l'ordre de grandeur du DA. En effet, chaque méthode présente nombre d'avantages et d'inconvénients en fonction de l'échantillon, du DA du polymère et de l'éventuelle présence d'interférences par d'autres composés. Kasaai (2009) a comparé les différences entre méthodes, parmi lesquelles on peut citer la spectroscopie UV, visible et infrarouge, la spectroscopie par résonance magnétique et la potentiométrie (ou titration), l'analyse élémentaire et la diffraction aux rayons X. Ramos-Ponce et al. (2010) ont récemment mis au point une méthode de spectrophotométrie basée sur la réactivité de la génipine (extrait de plantes médicinales) avec les groupes amines. Toutes les techniques s'adressent à une gamme de DA spécifique (Hein et al. 2007; Kasaai, 2009).

La répartition (PA^{12}) des unités de N-acétylglucosamines et glucosamines le long de la chaîne polysaccharidique est hétérogène. Cette caractéristique est également déterminante pour les propriétés de la chitine (Kumirska et al. 2009). D'après la figure I.18, on distingue plusieurs modes de répartition des motifs.

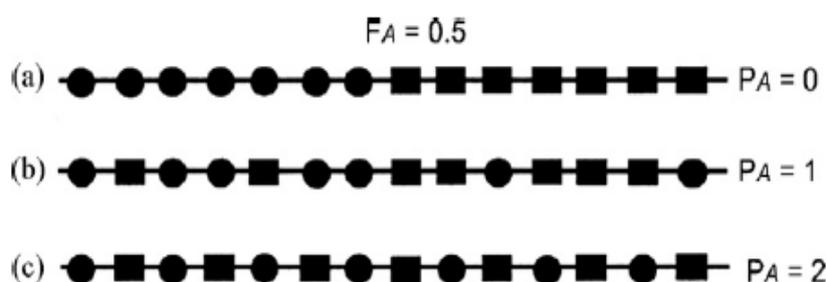


Fig.I.18: Schémas de distribution des groupes acétyles le long de la chaîne carbonée du chitosan, a) PA=0: répartition par blocs uniformes, b) PA=1: répartition aléatoire et c) PA=2: répartition alternée entre A et D.

Le DA et le PA influencent la solubilité de la chitine et de ses dérivés, les interactions entre les chaînes, leur flexibilité, leur conformation et par conséquent, leur domaines d'applications (Kumirska et al. 2009; 2010; Weinhold et al. 2009).

Il a été souligné que les conditions de production ont un impact sur les caractéristiques de la chitine et ses dérivés. Nous allons maintenant aborder la mise en œuvre du procédé classique d'extraction. Il s'agit de la voie chimique, employée traditionnellement par les industries.

¹² « PA » pour « Pattern of N-acetylation » correspond à la répartition des glucosamines acétylées ou non le long de la chaîne carbonnée

V. La production de chitine et de ses dérivés par voie chimique

V.1. Schéma général

La production de chitine repose sur la purification de la matière première. L'attention est principalement portée sur l'élimination du carbonate de calcium et des protéines. Bien que ce procédé réponde à la définition d'une purification, nous continuerons à employer l'abus de langage généralement admis qui consiste à parler d'« extraction » de la chitine.

L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entraînés au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur le DP et le DA du polymère (Rao et Stevens, 2005). Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau déminéralisée. La figure I.19 schématise un exemple de production de chitine et de ses dérivés.

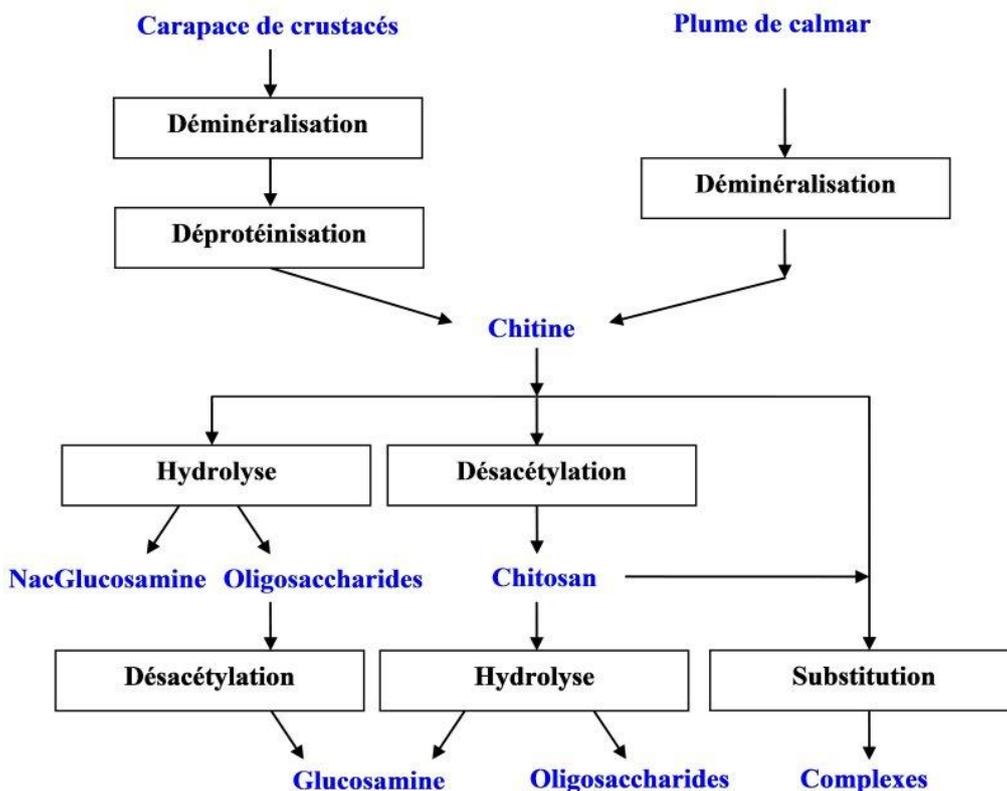


Fig.I.19 : Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés (France Chitine)

En amont, la préparation de la matière première est indispensable pour réduire les risques de dégradation de la chitine. Les modes opératoires sont propres à chaque entreprise, souvent basés sur le séchage pour éviter l'autolyse¹³ naturelle. France Chitine a fait le choix d'ensiler et de saler les carapaces de crevettes et de crabes pour les conserver. Elles sont ensuite rincées

¹³ Activité des enzymes endogènes

à l'eau distillée jusqu'à obtenir la conductivité d'une eau pure, puis séchées à froid. Enfin elles sont cryobroyées à l'azote liquide (Percot et al. 2003a). Cette méthode permet de stocker la matière première pour l'année, ce qui lisse les variations saisonnières. De plus, les produits extraits auront une couleur plus blanche, comparé au produit obtenu après séchage au soleil.

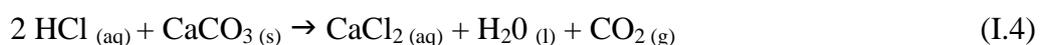
Les rendements en chitine dépendent du choix de la matière première et des conditions du procédé d'extraction. De plus, les travaux de Einbu (2007a) montrent des variations sensibles dans la composition des coproduits de crevettes au cours des saisons. De manière générale, à partir des ressources industriellement exploitées, le rendement est compris entre 20 et 40 % (Cf. section III ; Charoenvuttitham et al. 2006). Tolaimate et al (2003) soulignent que l'optimisation des conditions est fonction de la matière première. Par exemple, l'étape de déminéralisation à l'HCl est accentuée lorsque l'extraction s'effectue à partir de crabe ou de homard (HCl 2 M, T_{amb} , 5 à 48 h). Au contraire, pour le bouquet ou les calmars, la concentration en acide et la durée du traitement doivent être limitées (HCl 0,6 M, T_{amb} , 2 h). Ces conditions sont liées à la quantité de carbonate de calcium présente.

Le procédé d'extraction repose sur la déminéralisation et la déprotéinisation. Pour les réaliser, de nombreuses combinaisons de concentration en réactifs, durée, température et ratio réactif/substrat ont été testées. Les entreprises privilégient la formule qui convient à leur propre cahier des charges.

V.2. La déminéralisation

Le traitement acide élimine les minéraux, qui passent en solution sous forme de sels. Pour des raisons économiques, l'acide hydrochloridrique (HCl) est privilégié.

La concentration minimale, pour mener cette étape, est déterminée par l'équation chimique (I.4) de la réaction entre l'élément minéral majoritaire, le carbonate de calcium, et le HCl. En principe, la déminéralisation est complète dès lors où les proportions sont stœchiométriques, mais dans les faits, les entreprises utilisent des solutions en excès.



Les concentrations en HCl rencontrées sont comprises 0,5 et 11 N et le ratio substrat/solvant entre 1:10 et 1:40. La déminéralisation dure entre 15 min et 48 h, de la température ambiante à 50 °C (Tolaimate et al 2003 ; Al Sagheer et al. 2009). La réaction avec le carbonate de sodium est achevée lorsque le dégagement de CO₂ cesse.

Le **degré de déminéralisation** est un indicateur de la performance de la déminéralisation, il est défini par la formule suivante (Rao et Stevens, 2005):

$$\%DM = \frac{(A_0M_0) - (A_rM_r)}{A_0M_0} * 100 \quad (\text{I.5})$$

%DM est le degré de déminéralisation, M_0 et M_r sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, A_0 et A_r les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel respectivement.

L'influence de la granulométrie sur la déminéralisation a été étudiée par Marquis-Duval (2008). Un traitement acide de 30 min a été effectué sur trois lots de Chitane[®], cuticules de crevettes déprotéinisées par voie enzymatique. Trois catégories de tailles comprises entre 25 et 850 μm ont été comparées. Pour cette gamme de granulométrie, la déminéralisation atteint des teneurs en minéraux similaires, inférieures à 0,5 %. Cependant Levêque (Marquis-Duval, 2008) montre l'influence de la taille lorsque les fragments sont supérieurs à 2 mm. Les deux études s'accordent sur l'importance de la surface de contact entre le substrat et l'enzyme.

Il faut prendre garde à la production de mousse, causée par le dégagement de CO_2 . Elle peut être limitée par l'ajout d'un agent anti-moussant (No et Hur 1998). La déminéralisation est suivie par une étape de rinçage car le produit doit atteindre la neutralité avant l'étape suivante de déprotéinisation.

La prolongation de la durée du traitement, une température et une solution acide trop élevée conduisent à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et par conséquent à la dépolymérisation de la chaîne carbonée de la chitine et du chitosan (Lavall et al. 2007 ; Osorio-Madrado, 2010). La désacétylation peut intervenir en parallèle en fonction de la température et de la concentration en acide. Selon Gizatulina et al. (2005) la dépolymérisation est correctement décrite par une cinétique du premier ordre, en fonction de la concentration en HCl et dont le taux maximal est obtenu par une concentration de 29,8 %.

L'équipe de Varüm a mis en évidence que le traitement acide par HCl 0,1 M à 83 °C pendant 10 à 103 h entraîne à la fois la dépolymérisation et la désacétylation du polymère. La cinétique de lyse des liaisons *O*-glycosidique est similaire à celle des liaisons *N*-acétylglycosidique lorsque la concentration en acide est faible. La vitesse k de dépolymérisation et désacétylation est alors de l'ordre de 10^{-5} min^{-1} . À l'inverse, la liaison *O*-glycosidique est lysée presque 10 fois plus rapidement (k atteint alors à 10^{-4} min^{-1}) lorsque la concentration augmente de 0,1 à 1 M de HCl (Varüm et al. 2001). Le degré d'acétylation et le type de liaisons (A-A, A-D, D-A ou D-D) modifient également les cinétiques. Ainsi, Einbu et al. (2007b) montrent que le taux d'hydrolyse des liaisons *O*-glycosidique d'un oligomère de DP4 complètement désacétylé est 50 fois supérieur à celui de son homologue acétylé. La présence du groupe acétyle, chargé positivement, protège la molécule de la dépolymérisation.

V.3. La déprotéinisation

Lors de la description de la structure des cuticules (Chap.1.III), la forte interaction entre les protéines et la chitine a été décrite. Ceci implique des conditions drastiques pour les séparer.

Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH). Le plus courant, pour des raisons d'économie et technique, est l'hydroxyde de sodium (NaOH). Les concentrations utilisées sont comprises entre 0,3 et 2,5 M, selon un ratio compris entre 1:10 et 1:40. La température est comprise entre 50 et 110 °C et la durée peut varier de 1 h à plus de 24 h (Tolaimate et al 2003 ; Al Sagheer et al. 2009). Ces deux paramètres sont liés,

ainsi la durée doit être augmentée si la température est baissée, et réciproquement.

L'augmentation de la concentration, de la durée et de la température de réaction, améliorent la déprotéinisation (De Hollanda et Netto, 2006). Cependant, tout comme la déminéralisation, les conditions drastiques de la déprotéinisation modifient la structure native de la chitine. Par conséquent, le choix du couple temps-température est dicté par les caractéristiques de la chitine à obtenir. Les modifications que peuvent entraîner des conditions trop drastiques concernent la perte de poids moléculaire ou l'oxydation des extrémités réductrices (Crini et al. 2009).

Le **degré de déprotéinisation** est un indicateur pour suivre l'efficacité de la réaction, il est défini par la formule I.6 (Rao et Stevens, 2005):

$$\%D_{Prot} = \frac{(P_0M_0) - (P_rM_r)}{P_0M_0} * 100 \quad (I.6)$$

%D_{Prot} est le degré de déprotéinisation, M₀ et M_r sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé, P₀ et P_r sont les pourcentages de protéines dans le produit initial et résiduel respectivement.

Des travaux ont porté sur l'étude la cinétique de déprotéinisation à T_{amb} et NaOH 1 M (Percot et al. 2003a). Une formalisation de la cinétique est proposée suivant un modèle du premier ordre, $dP/dt = -kt$, caractérisé par trois étapes distinctes. Chacune présente une constante k différente. La première étape s'attaquerait préférentiellement aux acides aminés basiques. Au cours de la seconde étape, l'élimination des acides aminés acides rattrape celle des acides aminés basiques. Les constantes k diminuent au fur et à mesure de la déprotéinisation. Percot et al. (2003a) se sont également intéressés à l'énergie d'activation¹⁴ associée à la déprotéinisation. Elle diminue avec la durée du traitement. Ceci suggère que les composés protéiques résiduels sont plus difficiles d'accès ou protégés par des conformations chimiques. Par exemple il peut s'agir de lipoprotéines, dont les liaisons hydrophobes les protégeraient de l'hydrolyse.

Il existe peu d'études sur la nature et l'organisation des protéines dans les cuticules des crustacés (Percot et al. 2003a). Les compositions en acides aminés sont mesurées dans certains coproduits de crevettes, tels que *Parapenaeopsis stylifera* (Percot et al. 2003a), *Penaeus vannamei* (Armenta et Guerrero-Legarreta, 2009) et *Penaeus monodon* (Narayan et al. 2010). La composition diffère d'un substrat à l'autre. Généralement, le glutamate et la glutamine, dosés ensemble, sont majoritaires. L'acide aspartique/l'asparagine, l'arginine, l'alanine, la leucine, la valine et la proline sont abondants. Tandis que le tryptophane, la tyrosine, la cystéine, l'histidine et la méthionine sont faiblement présents. Mura et al. (1994) comparent l'évolution de la composition en acide aminé entre l'étape juvénile et adulte de *Chirocephalus kerkyrensis* et *C. diaphanus*, deux branchiopodes. Ils n'observent pas de modification sauf une augmentation d'arginine.

¹⁴ Quantité d'énergie nécessaire pour lancer un processus chimique

Des procédés alternatifs ont été expérimentés pour remplacer ou être combinés avec la déprotéinisation chimique. Un couplage avec une mise sous pression à 100 °C et l'utilisation d'un cuiseur (Boucher, 1991) a été proposé, ainsi que la sonication (Kjartansson et al. 2006a,b ; Marquis Duval, 2008). Kjartansson et al. (2006b) ont obtenu une réduction de la teneur en protéines résiduelles de 10,6 à 8,3 %, par 1 h de sonication, à partir de crevettes nordiques.

V.4. L'étape de blanchiment

Cette étape est optionnelle, elle n'est pas nécessaire si le barème temps-température penche en faveur d'une longue durée. Cependant, il est très difficile d'obtenir un produit pur à cause des fortes interactions entre la chitine, les pigments et les protéines. Une autre cause de coloration des produits peut être la réaction de Maillard qui implique les groupes azotés et les aldéhydes (Einbu, 2007a).

Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, il peut également être mélangé avec du HCl. La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes (Tolaimate et al. 2003). En effet, tout comme les deux précédentes étapes, les conditions de décoloration induisent une altération de la structure de la chitine, qui se traduit par une réduction du poids moléculaire. Les autres agents de blanchiment sont l'hypochlorite de sodium (NaClO), le permanganate de potassium (KMnO₄), l'acétone, l'éthyle-acétate et l'acide oxalique (No et al. 1989 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2003; Abdou et al. 2008 ; Xu et Winter, 2008). Du et al. (2009) utilisent le peroxyde d'hydrogène pour hydrolyser le chitosan, afin d'augmenter sa solubilité, et privilégient l'éthanol pour le blanchiment.

Le traitement chimique modifie le poids moléculaire et le degré d'acétylation de la structure originelle de la chitine, il détruit également la structure des protéines (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Pour réduire le risque d'altération du polymère lié à la déminéralisation et la déprotéinisation, il est conseillé de répéter plusieurs fois l'opération, pendant une courte durée et intercaler des phases de rinçage à l'eau distillée (Tolaimate et al. 2003). D'après Arguelles-Monal et al. (2000), 420 l d'eau par kilogramme de chitine sont consommés au cours de l'extraction chimique.

V.5. La désacétylation et la dépolymérisation

Des traitements acides et basiques sévères catalysent la dépolymérisation et la désacétylation (Gizatulina, 2005) et aboutissent au chitosan et aux oligosaccharides (Fig.I.20).

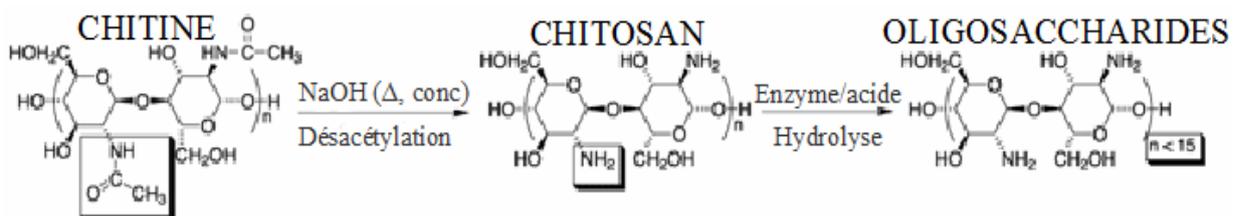


Fig.I.20 : Schéma des réactions chimiques de désacétylation et dépolymérisation – Sigma-Aldrich, Tutorial

Le chitosan est obtenu par désacétylation de la chitine. Tout comme le procédé d'extraction de la chitine, de nombreuses combinaisons de conditions de désacétylation sont décrites dans la littérature. Généralement, la chitine est chauffée au-delà de 80 °C (jusqu'à 150 °C), dans une solution de NaOH (ou KOH) concentrée entre 40 et 60 %, selon un ratio w/v entre 1:5 et 1:45, pendant au moins 10 h (Chang et al. 1997 ; Jaworska et Konieczna, 2001 ; Tsai et al. 2002 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). Le degré d'acétylation obtenu est généralement compris entre 30 et 50 % (Kurita, 2006).

Il est possible d'améliorer la désacétylation par une alternance de traitements alcalins et de rinçages à l'eau distillée, répétée successivement le temps suffisant pour obtenir le DA visé (Yaghibi et Mirzadeh, 2004). La désacétylation est homogène ou hétérogène (Tsigo et al. 2000 ; Lamarque et al. 2004). Le chitosan est davantage soluble par désacétylation homogène car le DD est plus élevé ($\approx 50\%$). Cependant la réaction dure plusieurs jours. Tandis que l'application de plusieurs étapes successives de désacétylation hétérogène permet d'atteindre un DD équivalent en quelques heures.

Galed et al (2005) ont étudié la désacétylation, par un traitement au NaOH 50 % (w) de 3 h à 110 °C, de trois crustacés *Paralomis granulosa*, *Lithodes antarcticus* et *Palinurus vulgaris*. Les cinétiques de désacétylation ont été formalisées par une équation du premier ordre et présentent des constantes de vitesses lentes, autour de $0,04 \text{ min}^{-1}$. Au contraire, Shahidi et Abuzaytoun (2005) rapportent que la cinétique de désacétylation est rapide dans la première heure puis peine à abaisser le DA du chitosan. Après 5 h de réaction, le DD n'augmenterait plus alors que le poids moléculaire diminuerait. La taille des particules de chitine aurait également un impact sur le rendement de désacétylation. Enfin, il faut souligner que la désacétylation est sensible à l'oxydation. Le problème peut être contourné en réalisant la réaction sous un gaz inerte ou en abaissant la pression. L'ajout de NaBH_4 , un agent antioxydant, protège le polysaccharide de la réduction des groupements aldéhydes en alditoles (Tolaimate et al. 2003).

L'une des techniques traditionnellement employée, la méthode de Broussignac, consiste à préparer un milieu anhydre composé de 50 % d'hydroxyde de potassium (KOH), 25 % d'éthanol à 96 % et 25 % de mono-éthylène glycol. Le mélange est chauffé à 90 °C avant d'ajouter la chitine peu à peu dans le réacteur. La température est alors élevée à une consigne qui dépend des adaptations à ce procédé, autour de 110 °C (Rhazi et al. 2000).

La dépolymérisation se traduit par hydrolyse des liaisons *O*-glycosidiques. Comme cela a été présenté précédemment, les traitements acides favorisent cette lyse (Kurita, 2006). En général, l'acide hydrochloridrique concentré est employé ou l'acide nitreux (HNO_2). Cependant, il provoque la désamination de la glucosamine (Kumirska et al. 2009) et l'excès de HCl conduit à la destruction des oses. Einbu et Varüm (2007) comparent la dépolymérisation selon différentes concentrations en HCl, comprise entre 3 et 12 M, le taux maximal est atteint avec 6 M. L'énergie d'activation des liaisons *O*-glycosidique et *N*-glycosidique semblent similaires. Le pH aurait également un impact important sur la dépolymérisation tandis que la présence d'oxygène n'aurait pas d'effet (Shahidi et Abuzaytoun, 2005 ; Holmes et al. 2001). Les oligosaccharides peuvent ensuite être séparés sur colonne par fractionnement (Jeon et al.

2000). D'autres méthodes existent, telles que la sonication (Kasaai, 2008) ou les radiations gamma (Min et al. 2004). Leur intérêt varie selon le type matière première.

VI. Les traitements biologiques

VI.1. La voie fermentaire

De nombreuses études font part de l'intérêt de la fermentation pour traiter les coproduits de crustacés. En effet, la production de protéases exocellulaires par certains microorganismes, combinée à la production d'espèces ioniques acides (comme l'acide lactique), équivaut aux conditions d'extraction de la chitine. Traditionnellement, la fermentation se déroule dans un réacteur où les conditions de température, pH, pression et agitation sont suivies. À l'issue de la fermentation, une filtration sépare deux fractions. La fraction solide est composée en majorité de chitine et la fraction liquide contient les autres constituants solubilisés. L'un des intérêts du procédé biologique résulte du potentiel de valorisation de cette dernière fraction.

Au cours de la fermentation, une protéolyse s'opère et libère des peptides et des acides aminés dont la digestibilité est améliorée par rapport aux protéines initiales (Bueno-Solano et al. 2009).

Wang et Chio (1998) exploitent les capacités de *Pseudomonas aeruginosa* K-187, source traditionnelle pour la production de protéases, chitinases et lysozymes. La fermentation dure 15 jours à 37 °C. Après 5 jours, la déprotéinisation atteint 81% pour les exosquelettes et 82 % pour les têtes. Au-delà, la déprotéinisation se poursuit lentement. Cette souche étant également riche en chitinases, Wang et Chio ont pris soin de contrôler l'activité propre aux chitinases, qui joue également un rôle dans la déprotéinisation.

Teng et al. (2001) rapportent que les fermentations par *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaseus* et *Aspergillus oryzae*, permettaient d'extraire la chitine en préservant la longueur des chaînes du polymère. Leur travail a porté sur la comparaison entre 34 mycètes. Trois *Aspergillus niger*, 0307, 0474 et 0576, ont été sélectionnés pour leur activité protéolytique et leur composition riche en chitine. Ces microorganismes consomment les protéines libérées et abaissent le pH. La fermentation dure 4 à 7 jours, à 30 °C. Le rendement en chitine est autour de 48 % et la teneur en protéines résiduelles entre 1,6 et 3,9%. Les souches fongiques présentent l'avantage de posséder une proportion de chitine dans leur structure externe. La teneur en chitine varie de 42 % pour *Aspergillus niger* à 2,3 % pour *Saccharomyces glutara* (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). *Mucor rouxii* est l'une des plus communément utilisées car sa structure possède directement la forme désacétylée de la chitine, le chitosan (8,9 à 35 % du poids sec). Cette proportion s'ajoute au rendement d'extraction. Les microorganismes sont éliminés par autolyse (Wang et al. 2009).

Après 14 jours de fermentation par *B. subtilis* à 30 °C, déprotéinisation et déminéralisation atteignent 86 % et 72 % respectivement, soit 6,1 % et 5,2 % de teneurs résiduelles (Sini et al. 2007). Le DA des produits obtenu est de 84 %. Manni et al. (2010) utilisent *Bacillus cereus* SV1, à pH 8 et 40 °C. Un ratio « protéines dans le substrat »/« enzyme » (w/w) de 20 est

appliqué. Après 3 h de réaction, la déprotéinisation atteint 88,8 %. Elle est suivie d'une déminéralisation chimique de 6 h à T_{amb} . Le DA est alors de 89,5 %.

La fermentation par bactéries lactiques est largement traitée dans la littérature (Zakaria et al. 1998 ; Khanafari et al. 2008). Rao et Stevens (2005) testent le potentiel de *Lactobacillus plantarum* 541 des coproduits de crevettes. La fermentation dure 24 h et l'inoculum est fixé à 5% en w/w. Les expériences comparent la fermentation avec ou sans acide acétique ajouté à l'autolyse. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la fermentation est soutenue par l'appoint d'acide acétique ajusté à pH 6. La déprotéinisation et la déminéralisation atteignent 66 % et 63 % respectivement à partir des cuticules de crevettes, tandis qu'elles atteignent 83 % et 88 % respectivement à partir de têtes de crevettes. Cependant, les teneurs en protéines et minéraux sont initialement plus élevées dans les têtes, par conséquent le rendement en chitine est plus faible. La composition en acides aminés dans la fraction liquide a été étudiée et comparée à des références alimentaires (bœuf, poudre de lait et œufs). Rao et Stevens prouvent ainsi la haute valeur nutritive de cette fraction.

Les cocktails de ferment lactique sont très prisés. Par exemple, Beaney et al. (2005) ont sélectionné *Lactobacillus salvarius*, *Enterococcus faecium* et *Pediococcus acidilactici*. La fermentation a lieu dans un bioréacteur où le pH n'est pas contrôlé. Le pH initial est de 11, il diminue rapidement (24 h) jusqu'à 6, puis la baisse se poursuit lentement jusqu'à 3,5 après 7 jours. La température est maintenue à 30 °C. À l'issue de la fermentation, les teneurs résiduelles en protéines et en minéraux sont de 11,9 % et 19,6 % respectivement. La déminéralisation est améliorée lorsque la taille des fragments de matière première est réduite.

Jung et al. (2007) étudient un mélange de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 et *Serratia marcescens* FS-3. Il est appliqué à des coproduits de crabes. À l'issue de la fermentation, le pH atteint 3,6. La déprotéinisation et la déminéralisation aboutissent à 68,9 % et 94,3 % respectivement. La fermentation par la souche *Pediococcus acidilactici* CFR2182, 72 h, atteint 97,9 et 72,5 % en déprotéinisation et déminéralisation respectivement. De plus, elle permet de récupérer 72,4 à 78,5 % d'astaxanthine (Bhaskar et al. 2007). Xu et al. (2008) dans une étude approfondie, comparent les rendements de déprotéinisation et déminéralisation par *Lactobacillus casei* MRS1 avec d'autres fermentations (Cf. Chapitre 4.I).

Depuis, Phuvasate et Su (2010) ont utilisé *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus acidophilus*, pour mener la déminéralisation. L'hydrolyse dure 5 jours à 30°C, elle est suivie par un lavage basique de NaOH 0,5 M à 25 °C pendant 4 h. Dans ces conditions, les teneurs résiduelles en protéines et minéraux sont de 4,89 % et 1,44 %. Par comparaison, un traitement acide par HCl ou acide lactique permet une déprotéinisation supérieure, tandis que la teneur en minéraux résiduels est négligeable. La fermentation par *Lactobacillus plantarium* a été appliquée à des coproduits des crevettes *Litopenaeus sp.* pendant 6 jours pour extraire de façon concomitante la chitine et l'astaxanthine. Pacheco (2010) obtient une déminéralisation de 80 % et une déprotéinisation de 91 % à 35 °C.

La difficulté à éliminer les protéines est récurrente (Gagne et al. 1993 ; Wang et Chio, 1998 ;

Zakaria et al. 1998 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2000 ; Healy et al. 2003). Le rôle préventif de la fermentation vis à vis des contaminations microbiennes est également souligné (Sini et al. 2007 ; Phuvasate et Su, 2010). Il repose sur la diminution du pH. Cependant, l'excès d'acide détruit les protéines les plus sensibles dans la fraction liquide (Wang et Chio, 1998).

Beaney et al. (2005) comparent l'extraction chimique à une extraction par fermentation lactique. À partir de ses travaux, les teneurs en protéines résiduelles sont de 2,1 % et 11,9 % par voie chimique et enzymatique respectivement, soit 5,6 fois moindre. L'élimination des minéraux est quasi-complète par la voie chimique et de 68 % par fermentation lactique. Le degré de déminéralisation semble être amélioré par la réduction des tailles. De plus, après désacétylation, le poids moléculaire et le degré d'acétylation ne présente pas de différences significatives (Beaney et al. 2005).

VI.2. Déprotéinisation et de déminéralisation enzymatiques

Les enzymes sont largement exploitées par les industries, en particulier les protéases. Leur activité principale est la lyse des liaisons peptidiques. Elles ciblent également les liaisons esters (Bornscheuer et Kazlauskas, 2004). Leur mode d'action fait intervenir une molécule d'eau, ce qui les place dans la catégorie des hydrolases. Parmi leurs domaines d'application en agroalimentaire, les protéases interviennent dans la fabrication de boissons, pâtisseries, fromages et autres produits laitiers, ainsi qu'à la transformation de viande et de poissons (Burstein, 2000). Elles interviennent également dans l'industrie du cuir, de la photographie et comme détergents, notamment dans les lessives (Yang et al. 2000). Dans le domaine médical, les protéases sont admises comme anti-inflammatoires, combinées avec des antibiotiques. Le principe d'utilisation des protéases se base sur leur capacité à éliminer des impuretés organiques, se substituant aux agents toxiques classiques (Rao, 1998).

Les protéases sont d'origine animale, végétale, microbienne ou fongique. Pour répondre à la demande actuelle, l'extraction des protéases se fait à partir de cultures en bioréacteur. Les liaisons peptidiques visées préférentiellement sont spécifiques à chaque protéase (Tab.I.7).

Enzymes	Origine	Site de clivage de liaison peptidique
Trypsine	Animale	-Lys (or Arg)↓---
Chymotrypsines, subtilisine	Animale/ bact.	-Try (or Tyr, Phe, Leu)↓---
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase	Bactérienne	-Asp (or Glu) ↓---
Papaïne	Végétale	-Phe (or Val, Leu)-Xaa↓---
Thermolysine	Bactérienne	---↓Leu (or Phe)---
Pepsine	Animale	-Phe (or Tyr, Leu)↓-Trp (or Phe, Tyr)

Tab.I.7 : Sites des liaisons lysées en fonction de l'enzyme (Rao, 1998).

Dès les années 60, des investigations se sont orientées vers les protéases pour extraire la chitine, entre pH 5 et 8 (Wang 1998). Roussina a testé la déprotéinisation par la papaïne, la pepsine et la trypsine en 1968. Gagne et Simpson (1993) ont déterminé les conditions optimales de déprotéinisation par la chymotrypsine et la papaïne, autour de pH 8 à 40 °C. À partir de coproduits de crevettes prétraités, les teneurs en protéines résiduelles sont de 1,3 % et 2,8 % respectivement.

Parmi les protéases étudiées pour leur capacité à déprotéiniser les coproduits de crustacés, les alcalases ont intéressé Synowiecki et Al-Khateeb (2000). Les conditions optimales d'activités se situent autour de pH 8,5 et 55 °C et le substrat (exosquelette de crevettes) est pré-déminéralisé. Après 4 h d'hydrolyse enzymatique et des étapes de rinçage/blanchiment, la fraction chitineuse récupérée présente des teneurs résiduelles en protéines et cendres de 4,45 % et 1,56 % respectivement.

Un argument en faveur de la déprotéinisation enzymatique est également sa capacité à préserver les peptides passés dans la fraction liquide à l'issue de l'extraction. Synowiecki et Al-Khateeb (2000) exploitent ce potentiel et obtiennent une fraction liquide contenant 64,3 % de protéines (en poids sec), caractérisées par un PER¹⁵ de 2,99. De plus, l'indice en acide aminés essentiels est de 125,4. Ces résultats sont supérieurs à la capeline (protéine du capelan, poisson d'Atlantique nord, utilisée comme référence de haute valeur nutritive), 2,64 et 99 respectivement.

De Hollanda et Neto (2006) procèdent à la même démarche en cherchant à extraire des coproduits de crevettes, la chitine, les protéines, ainsi que l'astaxanthine. La déprotéinisation est réalisée avant la déminéralisation, selon un degré d'hydrolyse de 6 %. La fraction liquide contient 77,58 % de protéines et 1,79 % de lipides. L'autre fraction contient de la chitine associée à 9,19 % de protéines et 2,44 % de cendres résiduelles. Puis l'expérience a été menée en utilisant une autre protéase, la pancréatine. La fraction qui contient majoritairement la chitine présente une composition similaire. Celle de l'hydrolysats montre un taux de récupération des protéines inférieur au précédent (39,5 % contre 49,5 % avec l'alcalase). Ces résultats ont montré qu'une augmentation du degré d'hydrolyse avait un effet controversé.

Le complexe enzymatique proposé par Novozyme, Protamex[®], a été utilisé pour valoriser des coproduits de crabes (Beaulieu et al. 2009). Les conditions de protéolyse sont fixées à 40 °C à pH 8, le ratio d'enzyme/substrat est de 1 g/1 kg et celui de la dilution est de 1 :1. Après hydrolyse enzymatique, le procédé développé consiste tout d'abord à séparer la fraction solide de la fraction liquide par décantation, puis à centrifuger cette dernière fraction, afin d'obtenir des phases spécifiques (Fig.I.21).

¹⁵ Protein Efficiency Ratio : indicateur basé sur le gain de poids (en g), par quantité de protéines ingérées (en g)

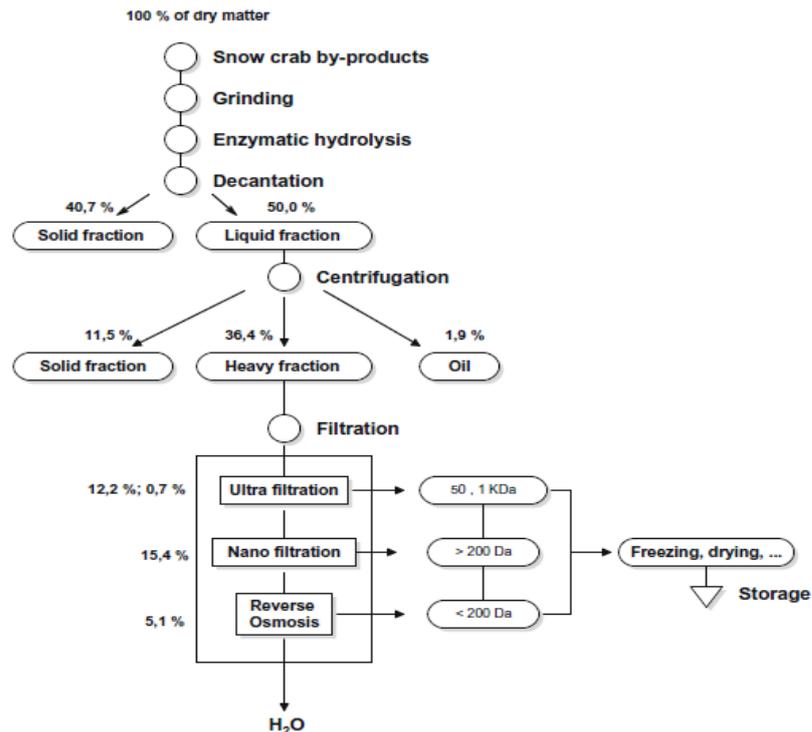


Fig.I.21: Schéma du procédé d'hydrolyse enzymatique par Beaulieu, 2009

La fraction solide contient 26 % de chitine et beaucoup d'impuretés protéiques et minérales, 15,6 % et 39,7 % respectivement. Le procédé est destiné à valoriser les acides aminés, peptides et acides gras polyinsaturés contenus dans l'hydrolysate. Cette étude est intéressante du point de vue des techniques de filtration. D'autres études se concentrent sur la valorisation des hydrolysats issus de l'extraction enzymatique de la chitine, telle que celle catalysée par l'alcalase 2,4 1 FG (Novo Nordisk®) 2h à 40 °C (Gildberg et Stenberg, 2001). L'hydrolysate contient 86% de protéines, 10 % de minéraux et 1 500 ppm d'astaxanthine, tandis que la partie solide, appelée « gâteau », subit un traitement chimique complémentaire pour extraire le chitosan.

Délaissée pendant quelques années, la déprotéinisation par la pepsine est de nouveau étudiée depuis 2002 (Chakrabarti, 2002; Babu et al. 2008), afin de valoriser les caroténoprotéines contenus dans les hydrolysats des coproduits de crevettes. Ils comparent les rendements d'hydrolyse enzymatique à partir de la trypsine (pH 7,6/45 °C), la papaïne (pH 6,2/55 °C) et la pepsine (pH 4/45 °C). Les résultats montrent que les rendements sont dépendants du type de matière première et généralement la trypsine offre les meilleures performances.

La déprotéinisation enzymatique par la papaïne a été étudiée sur des coproduits de crevettes *Penaeus vannamei* par Gartner et al. (2010). Cependant, les teneurs résiduelles en protéines et minéraux sont telles qu'un traitement chimique complémentaire est nécessaire. De plus, la papaïne coupe de façon aléatoire les liaisons *N*-glycosidique et les liaisons avec les protéines, ce qui initie la désacétylation de la chitine.

VI.3. Désacétylation et dépolymérisation enzymatique

VI.3.1. La désacétylation enzymatique

De nombreuses études traitent de la désacétylation enzymatique par l'action de chitinases ou chitosanyles. Ces enzymes sont référencées EC 3.51.41. Elles sont extraites de levures telles que *Colletotrichum lindemuthianum* ou *Mucor rouxii* ou *Aspergillus niger*, où elles participent au métabolisme des sucres (Tsigos et Bouriotis, 1995 ; Gildberg et Stenberg, 2001). Les chitinases peuvent également être extraites de l'hépatopancréas de crevettes (Esaiassen et al. 1996).

Tsai et al. (2002) ont comparé l'activité antimicrobienne de chitosans de différents DA. Ils ont utilisé de la chitine obtenue soit par voie chimique, soit par voie fermentaire par l'action de *Pseudomonas maltophilia*. Ensuite, chaque chitine est désacétylée soit par voie chimique, ou par voie enzymatique, par la trypsine, la pronase, la pepsine et la chymotrypsine. Les DA obtenus sont de 40%, 38 %, 37 % et 31 % respectivement. Ces travaux montrent également que l'activité antimicrobienne semble être améliorée par de faibles DA (ou forts degrés de désacétylation) et que la masse molaire diminue à mesure que le DA diminue.

La désacétylation enzymatique peut être catalysée par une chitine-désacétylase extraite de *Mucor rouxii* à pH 4,5 à 50 °C (Kafetzopoulos et al. 1993). Cette enzyme est active sur des substrats chitineux supérieurs à 4 unités et présente un degré d'activité plus élevé lorsque le substrat présente une solubilité plus élevée. Après 13 h de réaction à partir de chitosan pré-désacétylé (DA=42 %), le DD est égale à 98 % (Martinou et al. 1995, Martinou et al. 1998). *Aspergillus nidulans* est également une source de chitine désacétylase (Alfonso et al. 1995) ainsi que *Bacillus licheniformis*. À partir de cette souche, l'endochitinase extraite a été implantée dans *E. coli* pour produire une enzyme recombinante commercialisée (référéncée EC 3.2.1.14). Elle est appliquée pour convertir la chitine colloïdale en N-acétylglucosamine et chitobiose à pH 4-6, à 50 °C, 3 jours (Songsiriritthigul et al. 2010).

Par la voie chimique comme enzymatique, la chitine β est plus facile à désacétyler que son homologue α , qui est mieux protégé par sa conformation. La désacétylation enzymatique semble hydrolyser les liaisons N-acétyles de façon aléatoire (Kumirska et al. 2010).

Cai et al. (2006) explorent le potentiel de production concomitante de chitosan et d'acide citrique par *Aspergillus niger*. Les parois de cette levure contiennent du chitosan. Afin d'exploiter cette biomasse à l'issue de la production d'acide citrique, elle subit un traitement par des lysozymes, snailases et protéases neutres, pour rompre les membranes des cellules. Puis la partie solide est traitée par des désacétylases extraites de *Scopulariopsis brevicaulis*. Le produit obtenu est caractérisé par un poids moléculaire et un degré de désacétylation de $2,7 \cdot 10^5$ Da et 73,6 % respectivement.

L'un des avantages de la désacétylation enzymatique, revendiqué par rapport au traitement chimique, est sa capacité à mieux préserver le poids moléculaire initial du polymère (Martinou et al. 1995; Cai et al 2006). Les produits dérivés de chitine commercialisés sont

généralement des glucosamines de répartition de motifs A et D connus. L'entreprise Amicogen Inc (Chine) fournit des « ChitoOligo-100 » pour l'industrie agroalimentaire comme supplément diététique et pour l'industrie médicale comme immuno-stimulant, antimicrobien, et antitumoral.

VI.3.2. La dépolymérisation enzymatique ou la chitinolyse

La dépolymérisation enzymatique requiert des conditions plus douces, elle est plus spécifique et plus contrôlable que la dépolymérisation chimique (Li et al. 2005, Mourya et al. 2011).

Les chitinases et chitosanases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques sont classées comme « Carbohydre-Active enZYmes » (CAZY) dans la base des enzymes (Aam, 2010), et plus précisément dans la catégorie des « glycoside-hydrolases » (GH). Il a été démontré que les chitinases ne pouvaient hydrolyser que les liaisons **A-A**, contrairement aux chitosanases. De plus, ces enzymes ont généralement un mode d'action par reconnaissance des extrémités réductrices ou non et des sites de coupures privilégiés (Varüm et al. 1996, Mourya et al. 2011). Cette spécificité peut être exploitée pour produire des dimères, trimères ou tétramères de succession de motifs spécifiques (Aam, 2010).

Le chitosan est sensible à l'activité d'enzymes tels que les amylases, les cellulases, les dextranases, les pectinases, les lipases et les protéases dont la pepsine et la papaïne (Muzzarelli et al. 2002). La papaïne est une enzyme peu coûteuse et active à pH acide. L'hydrolyse est conduite 7 jours à pH 3,2 (en acide lactique) à 40 °C. La masse molaire (M_n) est réduite de 195 000 à près de 67 000 g/mol (Terbojevich et al. 1996). Cette étude montre également que la papaïne offre une meilleure capacité à dépolymériser que les lipases et les lysozymes. Ces derniers sont pourtant indiqués pour dépolymériser la chitine hautement acétylée, car elles ciblent les N-acétylglucosamine (Jeon et al. 2000).

Une comparaison entre l'hydrolyse chimique, par HCl à 37 %, pendant 30 min à 72 °C, et l'hydrolyse enzymatique, par Ultra Spl à pH 5,5 et 37 °C 24 h est réalisée par Cabrera et Van Cutsen (2005). Ils montrent que les chitoooligosaccharides sont plus courts et davantage désacétylés par la voie enzymatique.

Une protéase neutre extraite de *Bacillus subtilis* a été testée pour dépolymériser le chitosan (Li et al. 2005). Les conditions optimales ont été déterminées à pH 5,4 et 50 °C. Le ratio E/S appliqué a été de 1:20 (w/v). L'expérience a porté sur des chitosans de différents DA et de différents temps d'hydrolyse, les oligosaccharides obtenus étaient majoritairement des (NacGlu)₂, (NacGlu)₅ et (NGlu)₂-NacGlu. La dépolymérisation par une lipase fournie par Novozyme (Lee et al. 2008) a été réalisée entre pH 4,2 et 5,0, à 37 °C et 55 °C, et pendant 6 à 24 h. La cinétique de dépolymérisation semble être très rapide la première heure, puis ralentie, avant de présenter une réactivité très réduite à partir de 12 h. Les rendements d'hydrolyse sont plus élevés lorsque la température est stabilisée à 37 °C. Les oligosaccharides obtenus sont de DP 2 à 6. Ilankova et al. (2005) ont testé le potentiel de la pepsine pour dépolymériser le chitosan. Les conditions optimales ont été déterminées à pH 4,5 et 44 °C. L'hydrolyse se poursuivie 24 h, à l'issue desquelles le rendement se répartit entre 71,5 % de chitobioses, 19 % de NacGlu et 9,5 % de chitotrioses.

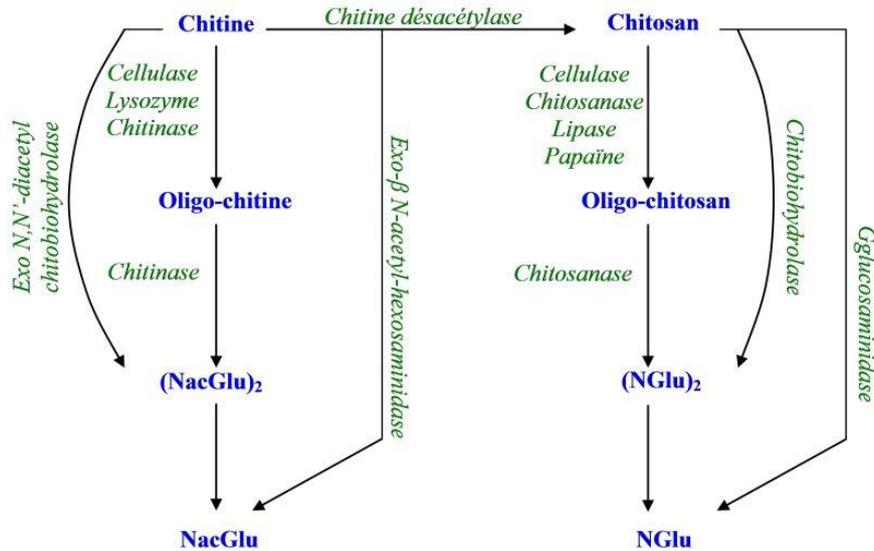


Fig.I.22: Voies enzymatiques de conversion de la chitine en dérivés désacétylés et dépolymérisés (Jeon et al. 2000)

Plusieurs modes opératoires sont disponibles selon la nature des produits à obtenir (Fig.I.22). La littérature décrit la spécificité des activités de plusieurs enzymes. Ainsi il est possible de combiner plusieurs enzymes, sous contrôle des conditions environnementales, afin de tendre vers des caractéristiques de DP, DA et PA précis. Les connaissances en génie enzymatique acquises depuis 2000 augmentent le potentiel décrit par la figure I.20. Le coût de la désacétylation et la dépolymérisation enzymatique étant supérieur à celui des traitements chimiques, elles sont réservées à la production de dérivés de chitine spécifiques.

VII. Les enjeux de la valorisation des produits marins

VII.1. Valeur ajoutée des coproduits marins

Dans un contexte général de valorisation des coproduits marins, l'extraction de la chitine n'est que l'une des voies exploitées. La majorité des coproduits marins est valorisée sous forme de farine et d'huile. Ils sont également convertis en hachis congelé et hydrolysats protéiques (Fig.I.23). Ces voies de transformation ne génèrent qu'une faible valeur ajoutée.

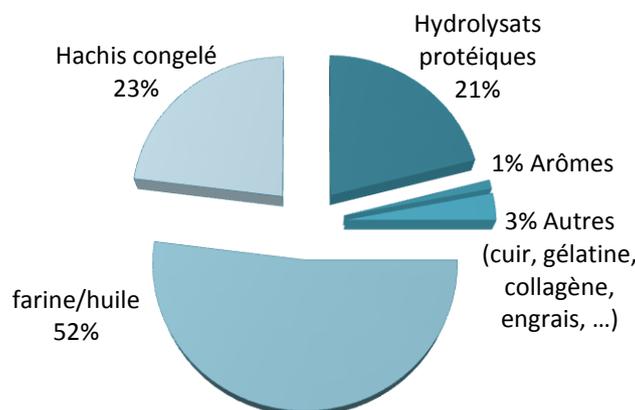


Fig.I.23 : Parts (en tonnage) des voies de valorisation de coproduits marins en France, Andrieux, 2004

Au premier trimestre 2009, les productions de farine et d'huile de poissons atteignaient respectivement 433 000 tonnes et 530 000 tonnes. Elles déclinent depuis 2004 alors que les prix augmentent. Le Pérou est le premier producteur (Globefish, 2010). Les hydrolysats sont issus d'autolyse (enzymes endogènes, exemple le nuoc mam, la sauce vietnamienne traditionnelle) ou d'hétérolyse (enzymes exogènes ajoutées). Ils se démarquent par une forte teneur en protéines et sont destinés à l'alimentation animale. Le hachis congelé peut être élaboré à partir de tous coproduits, excepté ceux des poissons cartilagineux et les viscères. Il est destiné au secteur du petfood (Dumay, 2006).

Pour atteindre une valeur ajoutée supérieure, il faut se tourner vers l'extraction de molécules spécifiques ou des valorisations particulières. La peau est utilisée pour la fabrication de cuir (Guérard et al. 2004). Parmi les molécules d'intérêt, on peut citer la chondroïtine sulfate, les vitamines et minéraux, l'élastine, les dérivés d'acides nucléiques et la kératine. Ces molécules sont utilisées en nutraceutique, diététique, cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire.

La farine de poissons est riche en protéines, de 72,5 à 80 %, et la teneur en lipides varie de 21,2 à 4,7 %, pour les poissons gras et maigres respectivement. La part d'acides gras insaturés est généralement élevée. Les hydrolysats comprennent 73 à 85 % de composés protéiques. Séchés, ils sont vendus en complément de la farine de poissons (site IFREMER).

VII.1.1. Les composés protéiques

La protéolyse est un mécanisme de lyse des liaisons peptiques. Par conséquent, elle induit une modification de la conformation des protéines et une réduction de leur taille en peptides et acides aminés. Leur digestibilité est ainsi augmentée, se traduit par une meilleure assimilation par l'organisme. De plus, la valeur nutritive est augmentée si les acides aminés libérés sont considérés comme essentiels (Bueno-Solano et al. 2009).

La part d'acides aminés essentiels dans l'alimentation est un facteur important pour les élevages et l'aquaculture. De nombreuses études portent sur les besoins spécifiques de chaque espèce. Millamena et al. (1997) se sont intéressés à l'apport en méthionine et thréonine nécessaire pour la croissance des juvéniles de *Penaeus monodon*. La figure I.24 illustre le mécanisme d'absorption des peptides.

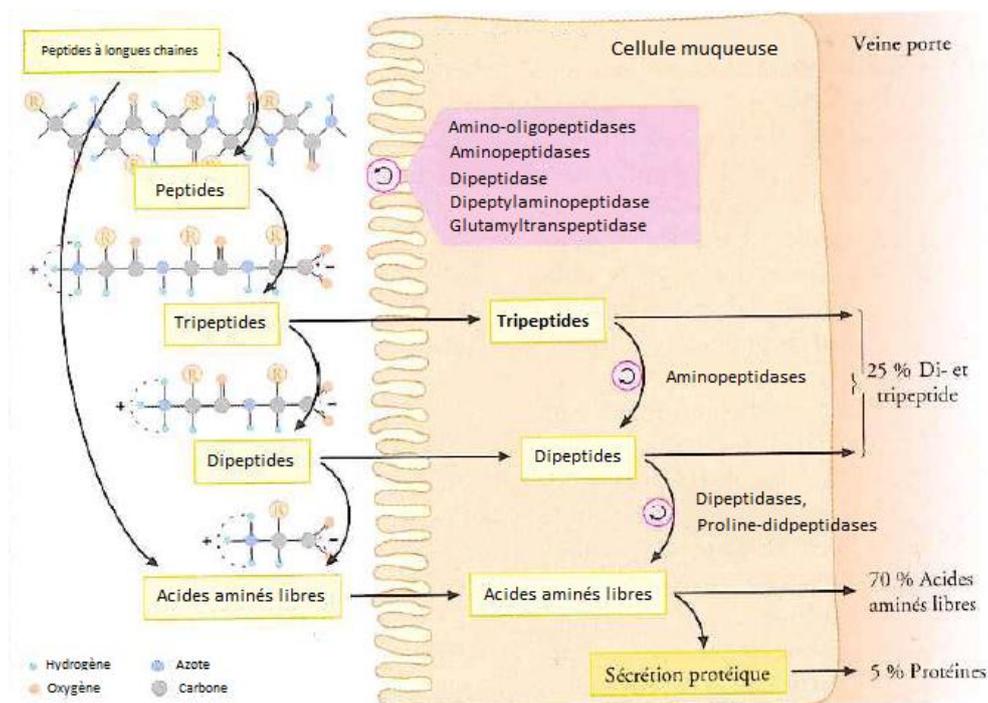


Fig.I.24 : Mécanismes de digestion et d'absorption des protéines par l'organisme

Bouglé (2007) étudie les activités biologiques des peptides marins, par exemple leur rôle dans la défense immunitaire, contre les infections et dans la prévention du cancer, ainsi que des complications cardio-vasculaires et métaboliques liées à l'obésité.

De plus, certains acides aminés sont responsables de notes aromatiques spécifiques aux crustacés (Narayan et al. 2010). Par conséquent, ils constituent des ingrédients intermédiaires pour l'agroalimentaire, comme compléments aromatiques incorporés dans des plats préparés, des soupes, etc. Ces composés peuvent être valorisés à partir de jus de cuisson issus des procédés de transformations des produits marins (Cros et al. 2004).

De nombreux peptides à activité antimicrobienne ont été identifiés chez les crevettes (Randriamahatody, 2011). Parmi eux, on citera les crustines et les pénaeidines. Les premières sont volumineuses, autour de 10 kDa et constituées de 84 à 144 acides aminés (Fleury et al. 2008). Les secondes sont cationiques, de 5,5 et 6,6 kDa et formées de 50 à 67 acides aminés. Elles doivent leur nom à leur isolation, pour la première fois, dans *P. vannamei*, par un laboratoire IFREMER (Brevet Destoumieux, 2000). De plus, leur activité antimicrobienne est liée à la présence de chitine (Destoumieux et al. 1997, 2000a, 2000b). Les microorganismes principalement visés sont les Gram + et en moindre mesure, les champignons.

VII.1.2. Les composés lipidiques

Les organismes marins sont capables de synthétiser des acides gras insaturés de la famille des $\omega 3$ et $\omega 6$, contrairement aux organismes terrestres. Cette capacité est liée à la température de leur milieu de vie. Les acides gras assurent l'élasticité des membranes à basse température. Ces acides gras sont également nécessaires aux organismes terrestres qui n'ont d'autres choix que l'apport alimentaire. À ce titre, les organismes marins constituent une source intéressante,

avec une teneur en acides gras jusqu'à 40 %, parmi lesquels l'EPA et le DHA (Bergé et Barnathan, 2005). Ces acides gras polyinsaturés sont conseillés pour réduire les risques de maladies liées au mauvais cholestérol et aurait des effets contre les inflammations, les ulcères et l'athérosclérose (Dumay, 2006)

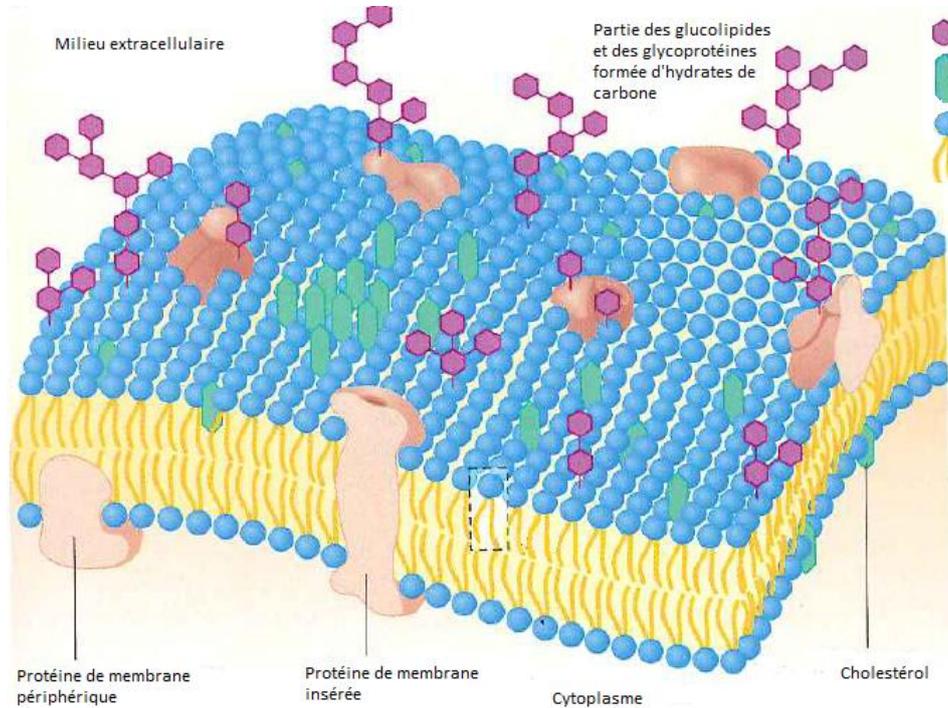


Fig.I.25 : Schéma d'une membrane cellulaire, répartition des composés lipidiques

La figure I.25 schématise la membrane cellulaire. Les phospholipides sont présents dans les membranes cellulaires de tous les organismes mais seraient en proportion supérieure dans les têtes de poissons. Ils sont souvent nommés « lécithines » lorsqu'ils sont utilisés comme additifs en agroalimentaire. Ils ont un rôle texturant grâce à leur pouvoir émulsifiant. De plus, ils présentent des activités biologiques, telle que l'activité antimicrobienne (Tamehiro et al. 2002).

Il existe d'autres composés lipidiques d'intérêt, tels que les sphingolipides, les squalènes ou les stérols, présents dans les produits marins. Cependant, leur proportion est négligeable chez les crustacés, à l'exception des terpènes. Une quantité importante de pigments issus de cette famille est présente dans l'exosquelette des crustacés. Ces pigments sont responsables du changement de couleur lorsque les crustacés sont portés à haute température (Fig.I.26). La conformation des molécules est modifiée ainsi que sa fréquence d'absorption.

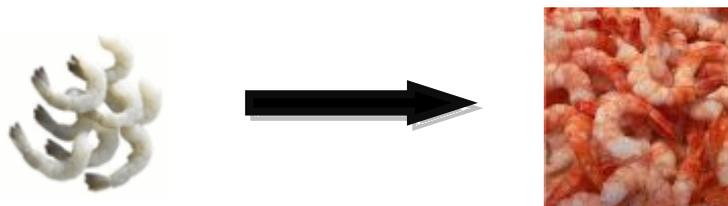


Fig.I.26 : La cuisson des crustacés modifie la conformation des pigments et donc change leur couleur

Les pigments des crustacés appartiennent à la famille des caroténoïdes, précurseur de la vitamine A. En générale, le pigment majoritaire est l'astaxanthine, entre 63,5 à 92,2 %. On trouve également du β -carotène et de la zéaxanthine (Sachindra et al. 2005). Ogawa et al. (2006) ont extrait, à partir de têtes de *Penaeus. vannamei* bouillies 15 min, 37,62 $\mu\text{g/g}$ de caroténoïdes dont 45 % d'astaxanthine, 33,5 % de β -carotène-5,6-époxyde et 21 % d'astacine.

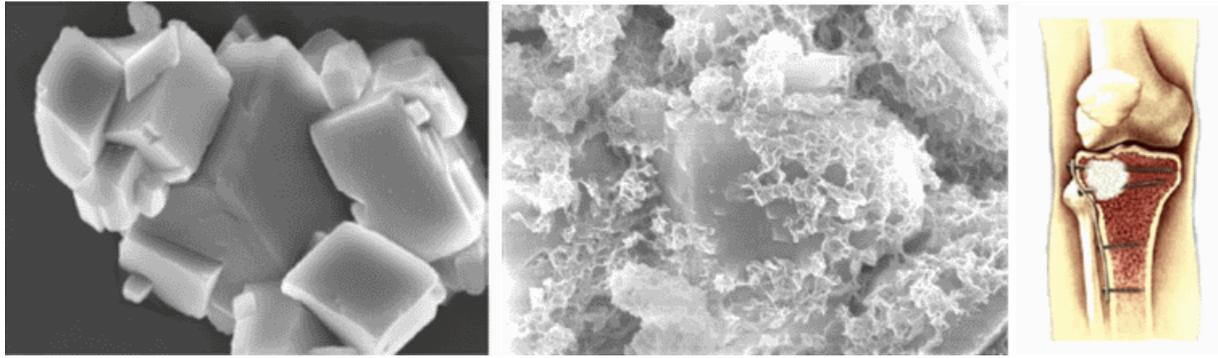
L'astaxanthine est particulièrement prisée par les éleveurs. Ajoutée à l'alimentation des volailles, elle colore leur coquille, ou ajouté à celle des saumons, elle rougit leur chair. De plus, son pouvoir antioxydant est largement démontré (Naguib, 2000 ; Guerin et al. 2003 ; Gimeno et al. 2007 ; Sachindra et al. 2008) et souligné par les industries cosmétiques et nutraceutiques.

De nombreux travaux menés par le groupe de Sachindra explorent les techniques d'extraction de l'astaxanthine à partir des coproduits de crevettes. Notamment l'extraction par des huiles végétales (Sachindra et Mahendraker, 2005), par fermentation 15 jours (Sachindra et al. 2007) et par voie enzymatique. L'activité de trois enzymes, l'alcalase, la papaïne et la trypsine, a été comparée sur des coproduits de *P. indicus*. Les rendements en caroténoïdes sont de 28,6 ; 24,8 et 25,3 $\mu\text{g/g}$ respectivement (Sachindra et al. 2011). Sowmya et al. (2011) ont extrait l'astaxanthine à partir de tête de crevettes *P. monodon*, par autolyse à pH 8 à 50 °C. Le meilleur rendement atteint $58,5 \pm 6,4$ %, après 4 h et selon un ratio de 1 : 2,5. Tandis que le plus fort pouvoir antioxydant est atteint lorsque l'autolyse dure 2 h selon le ratio 1 :5. Nawani et al. (2010) développent la possibilité d'extraire et de purifier les antioxydants des coproduits marins par les chitinases issues de *Bacillus* sp. et *Microbispora* sp. Auriolles et al. (2004) ont travaillé sur l'extraction des lipides totaux de crabes et homards, afin d'exploiter à la fois l'astaxanthine et les acides gras polyinsaturés dans cette matière première. Les résultats ont mis en évidence la forte valeur nutritive des extraits.

VII.1.3. Les minéraux

Les coproduits de crevettes sont riches en éléments minéraux, particulièrement en calcium. Il existe sous forme cristalline, semi-cristalline ou amorphe, l'indice de cristallinité indique la proportion de zone cristalline (Cf. V.1). Al-Sawalmih et al. (2008) ont étudié la distinction entre les zones amorphes de carbonate de calcium, de phosphates de calcium et les zones de calcites (forme cristalline) dans la cuticule de homard. Ils expliquent la répartition de chaque zone et leur rôle soit pour la rigidité de l'exosquelette et des canaux transversaux, soit pour la stabilisation générale.

Les complexes dérivés du calcium, tel que l'aragonite, l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) et son précurseur, le brushite (CaHPO_4), sont utilisés comme matériel de substitution en médecine (Fig.I.27). Ces biomatériaux sont à la fois actif et permettent de remplacer des tissus osseux ou des dents, c'est la raison pour laquelle ils sont aussi nommés « ciment ». Ils peuvent être intégrés sous forme de nanoparticules (Maity et al. 2011), fibres (Zhang et Darvell, 2011) ou associés avec des polymères, dont le chitosan (Peña et al. 2006 ; Paduraru et al. 2011). Ils sont généralement injectés liquides ou visqueux dans l'organisme où ils se solidifient (Komath et Varma, 2003). La solidification est progressive et dépend du pH.



FigI.27 : Cristal de calcite, support de nanocristaux de brushite (Maity et al. 2011) et ciment de phosphate de calcium appliqué (Callos® Bone)

Les calcium-orthophosphates sont indiqués comme ciment de reconstruction des tissus car ils sont biocompatibles et donc évitent les risques de rejets par l'organisme. Ainsi, ils sont indiqués pour les cas d'athérosclérose et de décalcification dentaire. Enfin, il faut également signaler qu'ils sont d'excellents engrais (Dorozhkin, 2007). Des instituts tels que le « British Calcium Carbonates Federation » au Royaume-Uni se sont dédiés aux voies d'applications de ces biomatériaux.

VII.2. L'hydrolyse enzymatique des coproduits marins

L'hydrolyse enzymatique des coproduits marins libèrent les composés à haute valeur ajoutée décrits précédemment. Pour cette raison, elle est de plus en plus étudiée. Appliquée aux têtes de crevettes *P. semisulcatus*, par l'action d'alcases, elle atteint un rendement massique de protéines dans la phase liquide de 45 %. Lorsque l'on ajoute du sulfite de sodium, le rendement atteint alors 62 %. Cette fraction protéique contient une part suffisante d'acides aminés essentiels pour l'alimentation animale et les résidus sulfites peuvent être éliminés par précipitation acide (Mizani et al. 2005).

VII.3. Les objectifs envisagés par cette étude

Le principal objectif de cette étude est d'appliquer l'hydrolyse enzymatique pour extraire la chitine à partir des coproduits de marins. Les travaux antérieurs ont démontré le potentiel de la fermentation lactique et des protéases extraites de microorganismes. Cependant, les teneurs en protéines et minéraux résiduels n'atteignent pas les niveaux équivalents à ceux obtenus par l'extraction chimique dans les mêmes délais. Le degré de pureté est suffisant lorsque la durée du traitement biologique dure plusieurs jours. De plus, les procédés décrits aux sections précédentes conservent généralement le principe d'extraire la chitine par deux étapes clé, l'une associée à l'élimination des minéraux, l'autre à celle des protéines. Certains traitements biologiques précédemment décrit, parviennent à accomplir les deux étapes, cependant les durées de ces traitements sont longues.

Des travaux ont été menés au laboratoire STBM par Randriamahatody (2010) sur l'hydrolyse enzymatique pour valoriser les coproduits de crevettes *Penaeus vannamei*. Ils ont mis en lumière le potentiel de la pepsine pour extraire la chitine. En effet, l'hydrolyse acide a libéré

des peptides actifs dans la phase soluble d'une part, et de la chitine purifiée dans la phase insoluble d'autre part. Ces résultats ont inspiré deux perspectives de valorisation :

- La première est l'application de l'hydrolyse enzymatique acide par une protéase telle que la pepsine. Le procédé repose sur une seule étape clé. De plus, la pepsine est une enzyme industrielle déjà utilisée en agroalimentaire (produits laitiers notamment) et sa cinétique d'activité est rapide.
- La seconde est l'exploitation des composés solubles de l'extraction. Habituellement détruits par les traitements chimiques, la voie biologique est plus douce et peut donc préserver leur structure.

Cette étude est l'occasion de confronter deux méthodes, le traitement chimique et le traitement biologique. Les liaisons entre chitine, protéines et minéraux, comme cela a été évoqué précédemment, sont fortes et font obstacle à la purification de la chitine. Avec les pigments se forment des complexes glycoprotéiques, lipoprotéiques ou glycolipidiques qu'il est difficile de séparer (Fig.I.28). Le traitement doux par hydrolyse enzymatique, sera-t-il suffisant pour concurrencer l'extraction chimique dont les conditions sévères favorisent l'obtention de chitine de haut degré de pureté ? Le cas échéant, l'hydrolyse enzymatique préservera-t-elle les caractéristiques physico-chimiques (DA, DP, Icr) de la chitine, contrairement à l'extraction chimique ? Ceci représentera-t-il une valeur ajoutée ? Les conditions sévères de l'extraction chimique détruisent les autres composés disponibles dans les coproduits de crustacés, telle que l'astaxanthine. La protéolyse acide sera-t-elle capable de préserver l'intégrité de ces composés ?

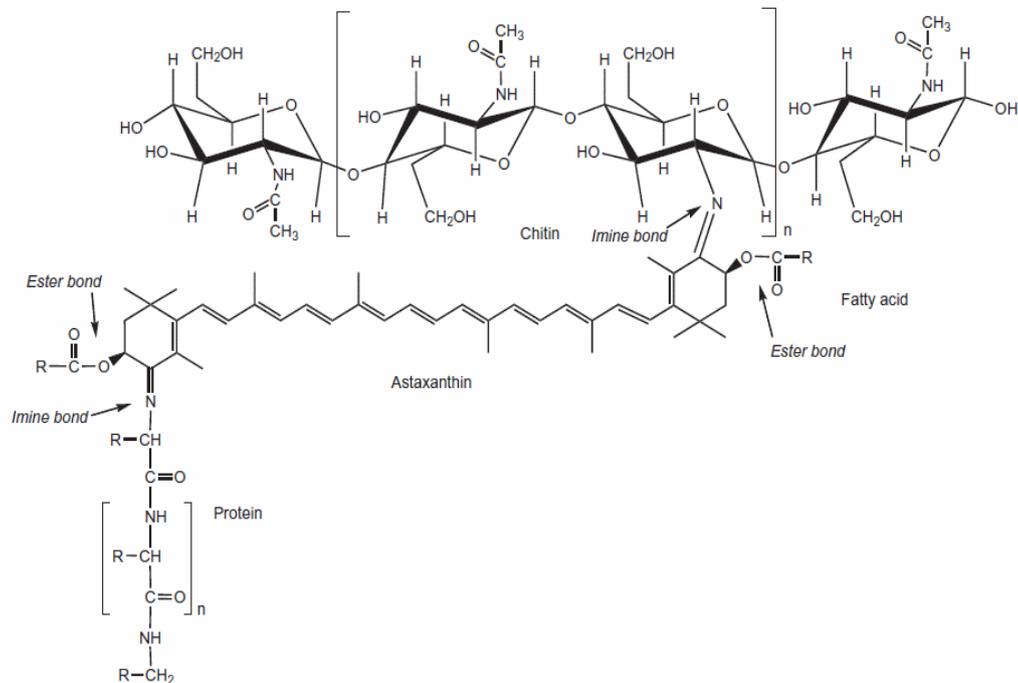


Fig.I.28 : Hypothèse de liaison entre chitine et protéines proposées par Armenta et Guerrero-Legarreta (2009)

Chapitre 2 – Choix des méthodes & application aux produits de référence

L'objectif général est d'estimer les performances de ce nouveau procédé et de les comparer au procédé classique. Pour atteindre cet objectif, la composition et les caractéristiques physico-chimiques des produits doivent être déterminées. Rappelons-le, la matière première est initialement constituée d'un réseau dense où chitines et protéines sont imbriquées. La principale difficulté est de quantifier distinctement ces deux polymères. Pour déterminer les critères de qualité de la chitine, la présence des protéines constitue également un obstacle. Ce chapitre compare les méthodes disponibles dans la littérature et justifie les choix méthodologiques qui ont été sélectionnés. Ces choix reposent sur des résultats d'analyses biochimiques et physico-chimiques appliqués aux produits de référence pour notre étude : la matière première, les produits commerciaux et les produits d'hydrolyse enzymatique modèles.

I. Méthodes d'analyse de la composition des produits

I.1. Identification et préparation de la matière première

La matière première utilisée pour cette étude est l'exosquelette de crevette blanche *Penaeus vannamei*. Les crevettes sont fournies par la compagnie Capitaine Cook et proviennent des côtes d'Amérique Centrale (principalement Equateur). Elles sont reçues congelées à -18 °C.

Les crevettes sont décortiquées à 12 °C, les carapaces sont ensuite lavées puis séchées entre 10 et 15 °C sous ventilation, à 50 % d'humidité relative. L'étape suivante consiste à broyer les carapaces au blender. Les fragments obtenus sont triés sur tamis afin de séparer trois tailles : inférieur à 1 mm, compris entre 1 et 2,5 mm et supérieur à 2,5 mm. La matière première ainsi obtenue est stockée dans des sachets sous-vide, placés en chambre froide à -20 °C.

La figure II.1 illustre les parts de produits obtenues par le décortiquage des crevettes. Elles se répartissent entre 50 % de chair, 30 % de têtes et 20 % de carapaces (en poids humide).

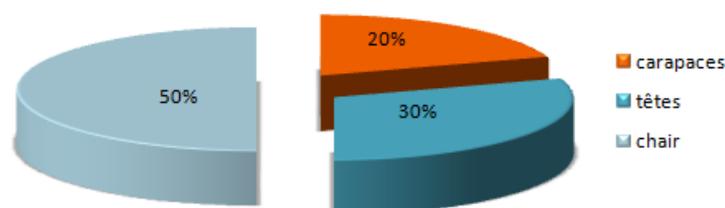


Fig.II.1 : Répartition des parts de produits et coproduits de crevettes (en pourcentage de poids humide)

I.2. Matière sèche

Pour estimer la part d'eau dans un produit, 1 à 2 g d'échantillon sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. La coupelle est placée 24 h dans une étuve à 105 °C, puis pesée après 30 min de refroidissement. L'expérience est réalisée en triplicat (AOAC, 1980).

La teneur en eau est déterminée dans la matière première et dans les produits d'extraction chimique et enzymatique. Ses produits sont marqués par une forte hygroscopie.

$$ES\% = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} * 100 \quad (\text{II.1})$$

ES % est la part d'extrait sec, M_0 le poids de la coupelle, le poids humide est ajouté, M_1 , et le poids sec final est de nouveau pesé, M_2 . La teneur en humidité correspond à la part complémentaire.

I.3. Teneur en cendres

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la chaleur. Environ 1 g d'échantillon est pesé dans une feuille de papier en aluminium de poids connu. Elle est repliée et placée au moins 5 h à 600 °C. Après refroidissement, elle est de nouveau pesée. Le poids des cendres résiduelles est assimilé à la teneur en minéraux. Chaque mesure est répétée trois fois (Méthodes de référence AOAC, 1980).

$$Cendres\% = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} * 100 \quad (\text{II.2})$$

Cendres% est la teneur en cendres, M_0 le poids du récipient, M_1 et M_2 sont les poids avant et après incinération respectivement.

Pour s'affranchir de l'influence des conditions environnementales (T° et P°), les supports (coupelles, creusets, feuille d'aluminium, etc.) peuvent être placés 1 h en étuve à 105 °C, puis refroidis 30 min dans un dessiccateur avant d'être utilisés. Tous les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche.

I.4. Teneur en lipides

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch et al. (1957). Le solvant organique utilisé est un mélange de méthanol/chloroforme (1:2, v/v). L'échantillon à analyser et le solvant sont introduits dans un erlenmayer à hauteur de 1:20 (substrat solide/ volume en ml). Après 1 h d'agitation, le produit est filtré sous vide à travers un verre fritté d'indice 3. Le filtrat est introduit dans une ampoule à décanter. Du NaCl à 0,9 % (w/v) est ajouté à hauteur de 0,2 (v/v total). Le mélange décante jusqu'à l'obtention d'un système biphasique net. L'ampoule est dégazée plusieurs fois, puis la partie huileuse, située dans la phase inférieure, est versée dans un ballon préalablement pesé. Le contenu du ballon est distillé sous rotavapor (pression de 220 bars), puis séché sous azote. Enfin le poids du ballon est pesé, la teneur en lipides est calculée par la différence de poids.

Les échantillons peuvent être humides (4 g dans ce cas) ou lyophilisés (1 g) puis dissous. La seconde option donne des résultats plus homogènes.

$$Lipides\% = \frac{M_2 - M_0}{M_1} \quad (\text{II.3})$$

Lipides% est la teneur en lipides, M_0 le poids du ballon, M_1 est la prise d'essai et M_2 est le poids du ballon contenant les lipides séchés après l'extraction.

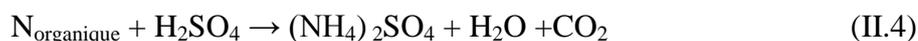
La phase huileuse séchée peut être conservée dans du chloroforme pour subir des analyses approfondies, sur la nature des acides gras qu'elle contient, en chromatographie.

I.5. Teneur en protéines

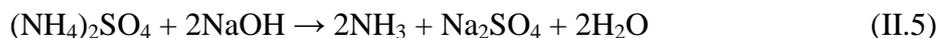
I.5.1. Dosage de l'azote par Kjeldahl (Crooke et Simpson, 1971)

La méthode de Kjeldahl a été développée par Johan Kjeldahl, chimiste danois, en 1883. Son principe consiste à doser la teneur en azote et d'utiliser un coefficient de conversion pour estimer la teneur en protéines. Le dosage repose sur trois étapes.

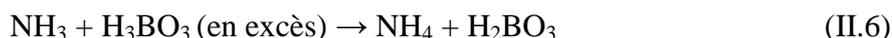
La première étape du dosage est la digestion acide, appelée également « minéralisation ». La prise d'essai est de 4 ± 1 g (poids humide), pesée dans un tube à minéralisation. On y introduit alors 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 à 96 %) et une pastille de $K_2SO_4/CuSO_4$ (5/2, w/w) qui catalyse la réaction en augmentant le point d'ébullition (Raul, 2009). Le mélange est porté lentement à 450 °C. La minéralisation convertit l'azote des composés amines et amides en ions ammonium NH_4^+ , lesquels se lient aux ions sulfates SO_4^{2-} . Le reste de la matière est digéré sous forme de CO_2 et H_2O . D'après l'équation (II.4), les espèces obtenues à l'issue de la réaction sont les suivantes:



Un changement de couleur vers le vert pâle ou le bleu indique la fin de la réaction. L'étape dure au minimum 2 h. Elle est suivie d'une neutralisation. Après refroidissement, 20 ml d'eau distillée sont ajoutés pour stabiliser le milieu, puis suffisamment de NaOH 10 M pour atteindre un volume final de 80 ml. La forte alcalinité convertie l'ammonium en ammoniac gazeux (II.5):



Le tube est placé dans une unité de distillation (Modèle K-314, Büchi Labortechnik AG, Suisse). La distillation transfère l'ammoniac gazeux vers une solution de 20 ml d'acide borique (H_3BO_3 , 2 %, w/w) en formant un complexe ammonium-borate (II.6):



La dernière étape est la titration de l'azote, sous sa forme complexée avec le borate, par l'acide hydrochlorhydrique 1 M. La solution à titrer contient un indicateur coloré qui vire au vert lorsque le pH est à l'équilibre. Le volume de HCl est alors identique à celui de NH_4^+ (II.7) :



Le pourcentage d'azote, %N, est donné par la relation (II.8) :

$$\% N = \frac{1.4 * V * [HCl]}{M} \quad (II.8)$$

V est le volume de HCl versé (en ml), [HCl] sa concentration (généralement égale à 1 g/l), M est la masse d'échantillon introduite dans les tubes (en g) et 14 correspond à la masse atomique de l'azote. La relation intègre le facteur 0,1 qui comprend la conversion du volume de HCl en litre et la conversion en pourcentage

Enfin, la teneur en protéines dans l'échantillon est déduite de la formule suivante (II.9) :

$$\% P = N * 6.25 \quad (\text{II.9})$$

La teneur en azote dans les protéines a été estimée en moyenne à 16 %, ce qui correspond à un coefficient de conversion entre azote et protéines de 6,25. Bien que communément admis, ce coefficient est parfois contesté, notamment lorsqu'il est appliqué aux produits marins, ces derniers étant plus riches en azote. Le coefficient de conversion varierait de 6,25 à $5,8 \pm 0,1$ (Gnaiger, 1984).

1.5.2. Méthodes de dosages colorimétriques des protéines

Plusieurs dosages colorimétriques servent à déterminer la concentration en protéines solubles. Ils partagent le même principe, basé sur la formation d'un complexe avec les liaisons peptidiques, détectés sous UV. La première étape consiste à solubiliser les protéines. Pour les substrats tels que les carapaces de crustacés, où les protéines sont intimement fixées à la chitine, il est nécessaire d'appliquer un traitement alcalin sévère pour garantir la solubilisation totale de la fraction protéique. Ce traitement ne doit pas solubiliser la chitine.

Environ 1 g d'échantillon est pesé dans un tube dans lequel est ajouté 10 ml de NaOH 2 M. Le tube est porté à 90 °C pendant 1 h. Après refroidissement, le contenu du tube est fractionné par centrifugation à 10 °C, pendant 10 min à 10 000 rpm. La fraction de protéines solubilisées se situe dans le filtrat, sur lequel s'effectue le dosage colorimétrique. Le tableau II.1 compare les caractéristiques de différents dosages.

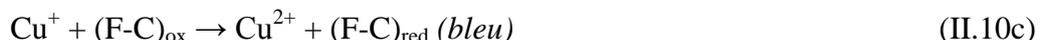
Dosage	Principe	Interférences
Biuret (Gornall et al. 1949)	Formation d'un complexe cuivre/ liaison peptidique/ biuret (NH ₂ -CO-NH-CO-NH ₂ composé issu de la condensation de l'urée) en milieu alcalin. Formation d'un complexe violet rose, lecture à 545 nm	Glycérol, certains peptides, saccharose
Lowry (Lowry et al. 1951)	Méthode de biuret complétée par le réactif de Folin-Ciocalteu (phosphomolybdate et phosphotungstate) qui se lie avec la Tyr et le Trp et, dans une moindre mesure, avec la Cys et l'His. L'absorbance est observée à 750 nm.	Forte influence de certains peptides, glycérol, saccharose, EDTA, détergents
BCA: acide bicinchoninique	Formation d'un complexe cuivrique très similaire à la réaction du biuret, entre le BCA, Cu ²⁺ et les liaisons peptidiques des protéines.	Thiols Tyr, Cys, Try, sucres réducteurs, ac. ascorbique et urique
Bradford (Bradford et al. 1976)	Le réactif est le bleu de Coomassie, il réagit avec l'Arg et, dans une moindre mesure, avec l'His, la Lys et les acides aminés aromatiques en milieu méthanolique acide. L'absorbance est mesurée à 465 nm.	Forte influence des détergents et bases fortes

Tab.II.1: Caractéristiques des principaux dosages colorimétriques des protéines (Tyr=tyrosine, Cys=cystéine et Trp=tryptophane, His=histidine, Arg=arginine et Lys=lysine)

La protéine de référence utilisée pour ces dosages est un sérum à base d'albumine bovine (BSA). La gamme étalon s'étend de 12,5 à 300 µg/ml pour nos expérimentations. Le choix de cette protéine de référence est lié à son accessibilité.

(a) Lowry: Ce dosage repose sur une double réaction. D'une part, un complexe cuivre-protéine est formé à partir des atomes d'azote des liaisons peptidiques, en condition alcaline

(II.10.a). Ce complexe est oxydé (II.10.b). D'autre part, les ions Cu^+ et certains radicaux d'acides aminés réduisent le complexe acide phosphotungstique/ acide phosphomolybdique contenu dans le réactif F-C pour Folin-Ciocalteu (II.11). Le produit obtenu développe une coloration bleue mesurée à 750 nm.



Au préalable, deux réactifs sont préparés à partir d'un kit Sigma. Le premier est un mélange d'une solution à 2 % de Na_2CO_3 (dans du NaOH à 0,1 N), d'une solution à 1 % du CuSO_4 (dans de l'eau distillée) et d'une solution de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, à 2 % (dans de l'eau distillée). Les proportions du mélange se répartissent respectivement entre 1:1:100 et il n'est plus stable lorsqu'il se trouble. Le second réactif est le réactif de Folin-Ciocalteu (F-C) à base d'acide phosphotungstique et de cuivre.

La prise d'essai pour chaque échantillon ou standard est de 0,5 ml, auquel on ajoute 2,5 ml du premier mixe de réactifs. Les tubes sont agités et maintenus à T_{amb} 10 min. On ajoute ensuite 25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Les tubes sont à nouveau agités. L'absorbance peut être lue après 30 min à T_{amb} à 745 nm. L'échantillon est reproduit en triplicat.

(b) BCA sur microplaques: les dosages ont été effectués sur des microplaques. Deux réactifs sont fournis par Sigma. Le premier correspond à l'acide bicinchoninique et le second au $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$. Au préalable, 1 ml du premier réactif est mélangé à 50 ml du second. La prise d'essai pour un dosage sur microplaques est de 25 μl pour 200 μl du mélange des réactifs. Les microplaques sont placées à 37 °C pendant 30 min. Après refroidissement, l'absorbance est lue à 555 nm. L'échantillon est reproduit en triplicat.

Les autres méthodes n'ont pas été testées sur nos produits, de même que le dosage du tryptophane à 280 nm. En effet, le tryptophane n'est pas un acide aminé majoritaire dans la cuticule de crustacés (Narayan et al. 2010). Chaque méthode colorimétrique est caractérisée par sa sensibilité, son seuil de détection et ses risques d'interférence avec d'autres espèces. Des précautions doivent être prises en ce sens (Peterson, 1979).

I.5.3. Dosage des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse

La composition en acides aminés est analysée par chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID). La première étape consiste d'abord à dégrader complètement les protéines en acides aminés par hydrolyse acide. Un échantillon lyophilisé d'environ 10 mg est pesé dans une ampoule dans laquelle est ajouté 200 μl de HCl 6 N. L'ampoule est scellée sous vide et placée 24 h à 110 °C dans un bain à sec. Puis l'échantillon hydrolysé est séché sous azote et dilué dans 2,5 ml d'eau milliQ. L'analyse des acides aminés est réalisée en utilisant la procédure EZ:Faast (Phenomenex, Etats-Unis) qui consiste en une étape d'extraction de la phase solide, suivie d'une dérivation et d'une extraction liquide/liquide. La phase organique qui contient les acides aminés dérivés est introduite dans une aliquote et analysée par un système CPG-

FID (Perkin Elmer Autosystem XL). Les acides aminés sont identifiés selon leur temps de rétention et quantifiés d'après une courbe d'étalonnage et leur facteur de réponse par rapport au standard interne (la norvaline ajoutée à une concentration de 200 $\mu\text{mol/l}$ dans chaque échantillon).

L'échantillon est reproduit en triplicat et l'absence d'interférences par la présence de NacGlu a été vérifiée. La technique ne permet pas de quantifier tous les acides aminés. Le tryptophane est détruit par l'étape d'hydrolyse acide. L'asparagine et la glutamine sont respectivement convertis en acide aspartique et glutamique. L'arginine n'est pas détectée et la cystéine l'est faiblement. Selon l'équipement et leur capacité à se volatiliser, le taux de recouvrement des acides aminés peut varier. Adams (1974) note un degré de recouvrement de 90 à 99 % par CPG, excepté pour l'arginine dont le recouvrement n'excéderait pas 78 %.

I.6. Teneur en résidus glycosidiques simples

I.6.1. Dosage colorimétrique de Dubois et al. (1956)

La méthode de Dubois et al. (1956) est utilisée pour estimer la teneur en résidus glycosidiques totaux. Elle n'est pas spécifique et réagit indifféremment avec les mono-oses neutres, les aldoses et les cétooses libérés par hydrolyse à l'acide sulfurique. Cette étape déshydrate les oses qui forment des hydroxy-méthylfurfural (HMF) à partir des hexoses ou des furfurals à partir de pentoses. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé).

Les gammes étalon peuvent être préparées à partir de glucose, fructose ou mannose, de 50 à 500 $\mu\text{g/ml}$. Dans chaque tube à essai, 500 μl de standard ou d'échantillon sont introduits. Puis 1 ml de phénol à 5 % est ajouté, les tubes sont vortexés et maintenus à T_{amb} 40 min. Puis 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré sont ajoutés et après 10 min, l'absorbance peut être lue au spectrophotomètre à 480 nm. L'échantillon est reproduit en triplicat.

I.6.2. Méthode de dosage colorimétrique des osamines

Les osamines ne sont pas concernées par le dosage de Dubois. Deux méthodes, issues du même principe, ont été comparées. Elles ont été utilisées pour estimer la teneur en chitine dans la paroi de certains champignons ou bactéries (Swift, 1973 ; Chen et Johnson, 1983).

La première étape consiste à pratiquer une hydrolyse acide poussée afin de convertir le polymère en unités glycosidiques. Pour cela, 10 mg d'échantillon sont introduits dans un tube Pirex, avec 5 ml de HCl 6 N. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et neutralisé.

(a) Méthode au DMAB – Elson Morgan. Un réactif A est préparé par dissolution de 6,1 g de di-potassium tétraborate tétrahydrate dans 80 ml d'eau distillée, ajusté à 100 ml. Un réactif B est préparé par ajout de 1,5 ml d'eau distillée à 11 ml d'acide chlorhydrique concentré (12 N), auquel on ajoute 87,5 ml d'acide acétique glacial. 10 g de para-diméthylamino-benzaldéhyde (DMAB-P5) sont dissous dans le mélange. Cette solution est diluée 10 fois avant utilisation. La gamme étalon est préparée à partir de N-acétylglucosamine ou de N-acétyl-galactosamine.

Une hydrolyse est réalisée en ajoutant 50 µl de réactif A à 250 µl de solution ou d'étalon. Les tubes sont chauffés 3 min à 100 °C, puis refroidis rapidement sous l'eau courante. 1,5 ml de réactif B sont ajoutés, puis les tubes sont agités et incubés 20 min à 37 °C. L'absorbance est mesurée à 585 nm (ou 550 nm en microplaques) après refroidissement des tubes. L'expérience est réalisée en triplicat.

(b) Méthode de Belcher et al. (1954). Les réactifs à préparer sont l'acide hydrochloridrique 8 N (66,6 ml de HCl 12 N dans 33,4 ml de H₂O), l'hydroxyde de sodium 4 N (à partir de 40 ml de NaOH 10 N dans 60 ml de H₂O), d'acétylacétone (avec 2 ml d'acétylacétone + 48 ml de carbonate de sodium à 0,625 M, solution elle-même préparée à partir de 6,62 g de Na₂CO₃ pur dans 100 ml d'eau) et de réactif d'Ehrlich, qui consiste à un mélange de 1,6 g de para-diméthylaminobenzaldéhyde dans 30 ml de HCl 12 N.

La gamme étalon est préparée à partir de 2 mg/ml de N-acétylglucosamines ou galactosamine, les concentrations s'étalent entre 0,1 et 1 mg/ml. Il est nécessaire de procéder à une étape préalable d'hydrolyse, 500 µl d'échantillon ou de standard sont introduits dans des tubes en verre avec 500 µl d'HCl 8 N, lesquels sont placés dans un bain à sec à 100 °C une heure. Puis, la neutralisation est obtenue par ajout de 850 µl de NaOH 4 N.

Le dosage consiste à prélever 250 µl de produit hydrolysé, les introduire dans un tube en verre avec 250 µl de réactif d'acétylacétone et 500 µl d'eau distillée. Une fois vortexés, les tubes sont placés en bain-marie à 100 °C une heure (prendre soin de recouvrir les tubes de papier d'aluminium pour la lumière). La température du bain est ensuite abaissée à 75 °C tandis que les tubes sont refroidis dans la glace. On ajoute alors 1,25 ml d'éthanol absolu dans les tubes, puis ils sont vortexés et placés à 75 °C. Après 5 min, on ajoute doucement 250 µl de réactif d'Ehrlich. Après 30 min, les tubes sont refroidis avant d'y ajouter 1,25 ml d'éthanol absolu. L'absorbance à 520 nm est lue après une attente de 30 min où les tubes sont maintenus à l'obscurité.

1.6.3. Dosage des résidus glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse

Le dosage des résidus glycosidiques par CPG est pratiqué selon la méthode de Kamerling et al. (1975), modifiée par Montreuil et al. (1986). L'appareil utilisé est un chromatographe HP-5890 (Hewlett-Packard), équipé d'une colonne capillaire apolaire en silice fondue CPSil-5CB (Chrompack). Les polymères subissent une méthanolyse. Les résidus glycosidiques sont ensuite triméthylsilylés afin de leur rendre plus volatils. Enfin, ils sont identifiés par CPG sous forme de glycosides de méthyle *O*-triméthylsilylés.

Ce dosage ne permet pas de distinguer les glucosamines des N-acétylglucosamines, à cause de l'étape de méthylsilylation.

I.7. Teneur en chitines

L'écriture non conventionnelle de « chitines » au pluriel souligne la variété de molécules désignées par ce terme. Généralement, l'objectif est de connaître la quantité totale de chitine incluant ses différentes formes. Cependant, certaines techniques s'adressent à une catégorie en particulier. De nombreuses méthodes de quantification ont été développées. La plus répandue, dite de gravimétrie, consiste à éliminer de l'échantillon tout autre composé que la chitine, par traitement chimique (Black et Schwartz, 1950). La masse de chitine est calculée par différence de poids entre l'échantillon initial et l'échantillon « nettoyé » (Cf. section II). Cette technique est destinée à tous les dérivés associés à la chitine, excepté les unités glycosidiques et les oligomères inférieurs au seuil de filtration, après le traitement chimique.

D'autres méthodes sont évoquées par la littérature (Muzzareli, 2003). Cependant, elles ont été abandonnées au cours du temps. Elles font appel soit à la colorimétrie (dosage des osamines, méthode peu reproductible et de faible recouvrement), soit au dosage de l'acide acétique, qui est libéré lors de l'hydrolyse de la chitine (Holan, Votruba et al. 1980). D'autres méthodes indirectes permettent d'estimer le degré de pureté en chitine. Elles vont être abordées dans la section III.

II. Méthode d'extraction de la chitine

II.1. L'extraction chimique

Selon le principe décrit par la section VI du chapitre 1, l'extraction chimique consiste en une déminéralisation acide et une déprotéinisation basique. Le protocole adopté est inspiré de l'étude de Tolaimate et al. (2003).

La matière première est préparée selon la description en I.1. Puis, environ 3 g sont prélevés et mélangés avec 30 ml de HCl 1 M dans un tube. Il est placé sous agitation 1 h à T_{amb} . Pendant cette étape, le CO_2 est éliminé sous forme gazeuse, c'est pourquoi le tube doit être ouvert. Le contenu du tube est ensuite filtré sur toile filtrante et rincé abondamment à l'eau distillée. Le retentât est introduit dans un flacon en Pirex, dans lequel sont ajoutés 30 ml de NaOH 1,25 M. La déprotéinisation dure 2 h dans un bain marie à 90 °C. Le contenu du flacon est à nouveau filtré sur toile filtrante et rincé abondamment à l'eau distillée. Le degré de déprotéinisation peut être amélioré par une étape intermédiaire, au bout d'une heure, de filtration et rinçage. Quand l'eau de rinçage n'est plus colorée, l'eau distillée est remplacée par un volume de 20 ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour blanchir le produit. Un ultime rinçage à l'acétone permet d'entraîner les impuretés lipidiques résiduelles. Le filtrat est alors transféré dans une coupelle préalablement pesée qui est placée en étuve à 90 °C pendant une nuit. Le nouveau poids de la coupelle, contenant le produit sec, permet de déduire le rendement massique d'après la formule générique (II.11) :

$$Y_m\% = \frac{M_f}{M_i} * 100 \quad (II.11)$$

Chaque extraction chimique est réalisée en triplicat.

II.2. L'extraction enzymatique par protéolyse acide

La mise au point du protocole d'extraction enzymatique de la chitine s'inspire des études décrites dans le chapitre 1, section VII.2. L'accent est porté sur la fusion de l'étape de déminéralisation et de déprotéinisation en une seule étape en milieu acide. Nous avons sélectionné la pepsine pour réaliser la protéolyse acide.

La première étape consiste donc en la préparation du milieu de réactif. Le solvant choisi est l'acide phosphorique, H_3PO_4 . La concentration de la solution est calculée de façon à atteindre les conditions stœchiométriques de la réaction II.12, avec le carbonate de calcium contenu dans la matière première. Le pH se stabilise autour de 2 lorsque la réaction est à l'équilibre ($pK_a = 1,9$). Ce pH coïncide avec l'activité optimale de la pepsine.



La prise d'essai de matière première est de 5 g environ, ce qui représente 1,125 g de $CaCO_3$. Le solvant est ajouté selon le ratio 1:5 (w/v). Par conséquent, 25 ml d'acide phosphorique à 0,9 M sont ajoutés au 5 g de matière première, dans un erlenmayer préalablement pesé. Le mélange est chauffé à 40 °C. Généralement, les paramètres du procédé sont stabilisés autour de 40 °C, concernant la température, et autour de 2 pour le pH, en 7 ± 2 min. L'enzyme est alors introduite dans le milieu réactionnel. Ce moment correspond au démarrage de l'hydrolyse enzymatique ($t=0$). Dès lors, l'erlenmayer est placé sous agitation magnétique, en étuve (Fig.II.2). Différentes concentration en enzyme et différentes durées d'hydrolyse seront appliquées. Puis le contenu de l'erlenmayer est filtré sur toile filtrante (0,45 nm) et rincé abondamment à l'eau distillée.



Fig.II.2 : Hydrolyse enzymatique d'exosquelette de crevette par la pepsine en milieu maintenu acide par H_3PO_4

Le résidu solide retenu par la toile filtrante est transféré dans une coupelle de poids connu, laquelle est placée dans une étuve à 90 °C pendant une nuit. Le poids est alors à nouveau pesé et permet de connaître la masse de produit récupéré. Cette partie correspond à la chitine et aux éventuels protéines et minéraux résiduels, qui n'ont pu être éliminés. Enfin, le rendement massique est mesuré par gravimétrie.

D'autre part, la phase soluble filtrée est neutralisée par de la soude 10 M. Le volume ajouté pour atteindre la neutralisation est noté. L'échantillon est ensuite lyophilisé pour des analyses postérieures.

III. Caractérisation qualitative des produits

III.1. Mesure du degré d'acétylation

$$DA(\%) = \frac{F_A}{F_D + F_A} * 100 \quad (II.13)$$

Le degré d'acétylation de la chitine correspond à la fraction molaire moyenne des unités de N-acétyl D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités (II.13). De nombreuses méthodes ont été développées pour déterminer le DA. Kasaai (2010) compare les avantages et inconvénients de chacune et cible les gammes de DA auxquelles elles s'appliquent.

III.1.1. Résonance magnétique nucléaire du liquide ¹H

La RMN aide à comprendre comment les structures moléculaires sont organisées. Lorsque les noyaux sont soumis à un champ magnétique, produit par un aimant, les interactions entre eux provoquent des résonances. Elles sont liées au spin, « I », qui est une grandeur intrinsèque des noyaux atomiques. Les noyaux retrouvent leur stabilité au bout d'une durée appelée temps de relaxation. La RMN mesure l'intensité des fréquences émises pendant le temps de relaxation. Or ces fréquences sont caractéristiques de l'environnement du noyau. Les atomes voisins causent un déplacement chimique spécifique, noté « δ » (Rouessac et al. 2004).

20 mg de chitine sont solubilisés dans 1 ml de DCl (7,6 N dans D₂O, Euriso-top) sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 h. L'analyse RMN ¹H est réalisée à 300 °K à l'aide d'un spectromètre Bruker ALS300 (300 MHz, référence TMSP 0,00 ppm). Le DA est déterminé selon la méthode de calcul décrite par Einbu et Varüm (2008).

$$DA(\%) = \frac{(I_{\alpha H1A} + I_{\beta H1A+H1D} + I_{H1A}) - I_{H2D}}{(I_{\alpha H1A} + I_{\beta H1A+H1D} + I_{H1A})} * 100 \quad (II.14)$$

Un groupe d'atome est identifié par son δ, connue grâce à des produits de référence (Tab.II.2).

Type de proto ou carbone	Position (δ, ppm)
H ₁ (GluNAC)	4,62 - 4,85
H ₁ (GluNH ₂)	4,85 - 4,97
H ₂ (GluNH ₂)	3,18 - 3,24
H ₂ (GluAc)	3,38 - 3,65
H ₃ (GluNH ₂)	3,52 - 3,87
H ₃ (GluNAC)	3,52 - 3,65
H ₃ , H ₄ , H ₅ , H ₆ , H ₆	3,74 - 4,34
H _N -COCH ₃	1,95 - 2,09
CH ₃ COOH (AcOH)	2,09 - 2,11
C ₁	102,7 - 105,7
C ₂	55,2 - 57,6
C ₃	73,1 - 75,7
C ₄	80,9 - 85,7
C ₅	73,1 - 75,7
C ₆	59,6 - 60,8
N-CH ₃ (C ₇)	22,8 - 23,3
N-C=O (C ₈)	173,6 - 173,8

Tab.II.2 : Déplacements chimiques des protons et carbones en RMN (Kasaai,2010)

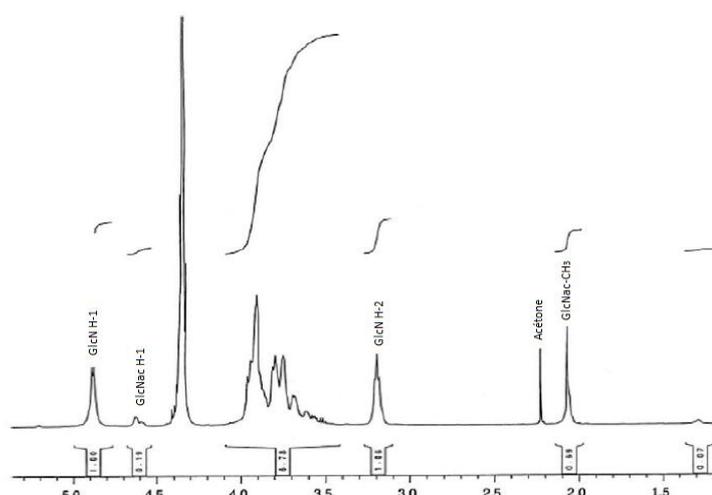


Fig.II.3 : Spectre 1H RMN de chitosan, 600 MHz, en D₂O, à 65 °C, (Yang et Montgomery, 2000)

La figure II.3 montre le spectre de RMN ^1H du chitosan. L'absence de proton méthyle entre 1,0 et 1,5 ppm serait un gage de pureté (Al Sagheer et al. 2009). L'intensité des fréquences est liée à la quantité dudit groupe d'atomes, l'analyse qualitative est donc possible. De plus, cette technique peut être utilisée pour distinguer les allomorphes de la chitine α et β (Cardenas et al. 2004).

III.1.2. Résonance magnétique nucléaire du solide en ^{13}C et ^{15}N

Les mesures de degré d'acétylation par RMN du liquide ^1H sont comparées à des mesures effectuées en RMN du solide ^{13}C et ^{15}N . Le temps d'acquisition est plus long pour la RMN du solide, en particulier celle du ^{15}N . Le spectromètre utilisé est un DRX AVIII à 400 MHz, accompagné d'une sonde 4 mm CPMAS H/X. La température est de 20 °C et la rotation de 9 KHz. La référence externe de déplacement chimique est la glycine ($\delta^{13}\text{CO} = 176,03$ ppm, $\delta^{15}\text{NH} = 110$ ppm). En RMN du ^{13}C , le temps de contact est de 1 ms (AQ= 44 ms, D1= 5 s, Ns= 8 192). En RMN du ^{15}N , il est de 2 ms (AQ= 44 ms, D1= 1 s, Ns= 31 7440 pour la chitine commerciale et 256 000 pour le produit d'hydrolyse).

III.1.3. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier - FTIR

Cette technique simple à mettre en œuvre, est largement utilisée pour étudier la composition et la structure de la chitine, pour distinguer la forme α de la forme β (Duarte et al. 2002 ; Cardenas et al. 2004) et parfois pour déterminer le degré d'acétylation (Einbu, 2007 ; Ng et al. 2006). Le principe de la spectroscopie infrarouge se base sur les émissions de vibrations entre deux atomes. Elles sont spécifiques à chaque environnement atomique. Ces vibrations sont identifiées selon leurs fréquences.

Pour la chitine pure, ces fréquences ont été identifiées et commentées par de nombreuses études, dont l'une des premières est celle de Pearson et al. (1960). Le tableau II.3 situe les absorbances des principales bandes caractéristiques de la chitine :

<i>Absorbance (cm⁻¹)</i>	<i>Structure</i>
3450	OH, groupe hydroxyle
3360	NH, vibration étendue
2920, 2880, 1420, 1275, 1245	CH ₂ (symétrique ou asymétrique) du cycle pyranose
1730	Groupe carbonyle
1660	C=O du groupe amide (I)
1560	NH du groupe amide, vibration repliée
1590	NH ₂ de groupe amine
1415, 1320	OH et CH du cycle
1380	CH ₃ du groupe amide
1255	Groupe C-O
1150-1040	-C-O-C- de la liaison glycosidique
850, 838	Groupe CH ₃ COH

Tab.II.3 : Pics caractéristiques en FT-IR de la chitine (Pawlak et al. 2003)

Il faut ajouter à ce tableau la présence systématique du doublet à 1 626 cm⁻¹ et 1 663 cm⁻¹, associé à la chitine α et attribué aux vibrations entre les groupes C-N et C=O de l'amide 1^{aire},

liés par un pont hydrogène aux groupes OH. L'apparition d'un pic à $1\ 656\text{ cm}^{-1}$ correspond à un état amorphe, où les vibrations détectées correspondent aux liaisons entre l'amide 1^{aire} et le groupe C=O. Les bandes à $3\ 474$ et $3\ 434\text{ cm}^{-1}$ indiquent les vibrations de groupes hydroxyles. De larges bandes entre $3\ 500$ et $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ indiquent que ces groupes sont soit libres, soit impliqués dans des liaisons hydrogènes faibles. Des bandes à $1\ 345$ et $1\ 344\text{ cm}^{-1}$ peuvent correspondre respectivement aux vibrations de CO-NH et à CH₃ déformées symétriquement. Une bande à $1\ 557\text{ cm}^{-1}$ indiquerait la vibration entre N-H d'un amide 2^{aire} déformé. Enfin, l'intensité à $1\ 159\text{ cm}^{-1}$ est modifiée lorsque les chaînes sont réduites par dépolymérisation. (Ravindra al. 1998 ; Duarte et al. 2002 ; Al Sagheer et al. 2009).

La spectroscopie FTIR permettrait de déterminer le degré d'acétylation. Le principe repose sur le rapport des aires entre bandes caractéristiques de la N-acétylglucosamine, de la glucosamine ou de la chitine. Plusieurs formules sont proposées, selon les études (II.4) :

<i>Formule</i>	<i>Source</i>
A_{1550}/A_{2878}	Sannan et al. 1978
A_{1655}/A_{2867}	Miya et al. 1980
A_{1655}/A_{3450}	Moore et al. 1980 ; Domszy et al. 1985
A_{1554}/A_{897}	Miya et al. 1985
A_{1554}/A_{3450}	Baxter et al. 1992, Roberts et al. 1992
$(A_{1655} + A_{1630})/A_{3450}$	Shigemasa et al. 1996
A_{1626}/A_{2877}	Duarte et al. 2002

Tab.II.4 : Exemples de le relations employées pour déterminer le DA via la spectroscopie FT-IR

Le mode opératoire consiste généralement à broyer 1 mg d'échantillon avec 100 mg de KBr (Fluka). Le mélange est compacté sous presse afin de former une pastille. Celle-ci est placée dans le spectromètre, sous le faisceau de rayons infrarouges. Il est important d'éliminer l'humidité à l'intérieur du spectromètre avant la prise de la mesure. L'appareil est un Nicolet iS10 de Thermo Scientific avec un accessoire Smart iTR (pour l'analyse ATR) et le logiciel est OMNIC 8,1. L'énergie absorbée entre $1\ 200$ et $3\ 000\text{ cm}^{-1}$ est enregistrée. Les spectres des échantillons sont alors comparés entre eux et aux standards.

III.2. Mesure du degré de polymérisation

La section IV du chapitre 1 explique le lien entre la longueur de la chaîne exprimée par le degré de polymérisation et la masse molaire. Cette dernière est estimée via la mesure de la viscosité intrinsèque, à l'aide d'un viscosimètre à capillaire, selon l'équation de MHS (Cf. Chapitre 1.IV.2) :

$$[\eta] = K * M_v^a \quad (\text{II.15})$$

Pour rappel, **K** et **a** sont deux constantes, **η** la viscosité réduite et **M_v** la masse moléculaire viscosimétrique. Les constantes sont déterminées à partir d'une courbe qui exprime le log de **η** en fonction du log de **M** (établie grâce à des solutions de masses moléculaires fixées). La constante **a** correspond à la pente de la droite et **K** correspond à la valeur de l'ordonnée à l'origine. Elles varient selon la température ambiante, les caractéristiques du solvant et du produit. Pour cette étude, les coefficients utilisés sont ceux établis par Poirier (2000) 0,95 et $7,6 * 10^{-5}$ dl/g respectivement. La viscosité réduite est déterminée par un viscosimètre

capillaire d'Ubbelohde. Des solutions de différentes concentrations en chitine sont préparées et le temps d'écoulement entre les deux repères (Fig.II.4) est noté pour chacune des solutions.

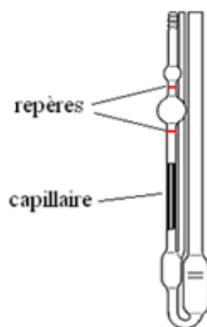


Fig.II.4 : Viscosimètre capillaire d'Ubbelohde

La viscosité réduite correspond à la viscosité intrinsèque lorsque les concentrations tendent vers zéro. On peut alors utiliser la formule II.15 pour déterminer M_v .

III.3. Mesure de l'indice de cristallinité

L'indice de cristallinité (I_{Cr}) indique la proportion de zone cristalline dans l'échantillon de chitine (Chapitre 1, section IV.1). L'indice I_{Cr} se détermine par diffraction aux rayons X. Cette technique distingue les zones cristallines des zones amorphes.

Les diagrammes de diffraction ont été enregistrés sur un diffractomètre D8 Discover de Bruker-axs (Karlsruhe, Allemagne) toutes les 10 minutes. La radiation ($Cu K\alpha_1 = 1,5405 \text{ \AA}$), produite dans un tube cuivre, scellé à 40 kV et 40 mA, a été sélectionnée et parallélisée par l'utilisation de miroirs de Gobel croisés et collimatés pour produire un faisceau de $500 \mu\text{m}$. Les données de diffraction ont été recueillies en utilisant un détecteur deux dimensions GADDS. Les échantillons sont placés entre deux feuilles de ruban-adhésifs afin de prévenir d'une perte d'humidité.

Deux méthodes sont répertoriées dans la littérature pour déterminer l'indice I_{Cr} d'après les résultats de diffraction. Une déconvolution est pratiquée à partir des spectres d'intensité des radiations. Cette opération consiste à séparer distinctement chaque pic et déterminer chacune de leur aire. Les pics associés aux zones amorphes et cristallines ont bien été référencés (Osorio-Madrado et al. 2011)

- La méthode de Focher et al. (1990) consiste à identifier le pic d'intensité maximale, noté I_{110} , (à $2\theta = 20^\circ$ dans le plan de réflexion $(110)_h$) et l'intensité du pic représentatif des hydrates amorphes, noté I_{am} (autour de $2\theta = 16^\circ$) :

$$I_{Cr} = (I_{110} - I_{am}) / I_{110} \quad (II.13)$$

- La seconde se base sur le rapport entre la somme totale des aires des zones cristallines sur la somme totale des aires.

Jaworska et al. (2003) comparent les deux méthodes et mettent en évidence leur manque de corrélation. La fiabilité de la première méthode semble dépendre à la structure de

l'échantillon tandis que la seconde semble plus cohérente (Osorio-Madrazo et al. 2010).

III.4. Caractérisation des propriétés thermiques

III.4.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Le principe de cette méthode repose sur la stabilité thermique des produits. L'échantillon est déposé dans une coupelle préalablement pesée. Elle est introduite dans un four, chauffé progressivement par induction. Le poids est mesuré régulièrement pour suivre la perte de masse en fonction de l'augmentation de la température.

L'ATG s'applique aussi bien à des composés purs qu'hétérogènes. Pour cette étude, les produits analysés sont la matière première, l'exosquelette de crevettes lavé, séché et broyé finement (<1 mm), la chitine commerciale (Mahtani), la *N*-acétylglucosamine, la glucosamine et le chitosan commercial (Sigma). Enfin, les produits issus d'hydrolyses enzymatiques sont analysés, à la fois les fractions solubles et insolubles. La partie insoluble, contenant la chitine, est analysée soit brute soit traitée par nettoyage chimique (NaOH 1,25 M, 1 h à 90 °C). Cette étape réduit efficacement la teneur en protéines et sensiblement la teneur en minéraux. Elle permet donc d'obtenir une chitine purifiée si la teneur en minéraux du produit est faible.

L'appareil utilisé est le modèle TGA 2050 de TA Instruments. Les échantillons sont pesés sur une nacelle en alumine préalablement pesée. Le dispositif général de l'ATG est représenté par la figure II.5. Le programme de la montée en température est le suivant :

- montée en température initiale de 10 °C/min jusqu'à 125 °C
- 10 min de stabilisation thermique à 125 °C
- 1 °C/min jusqu'à 700 °C sous azote
- 10 min de stabilisation thermique à 700 °C.

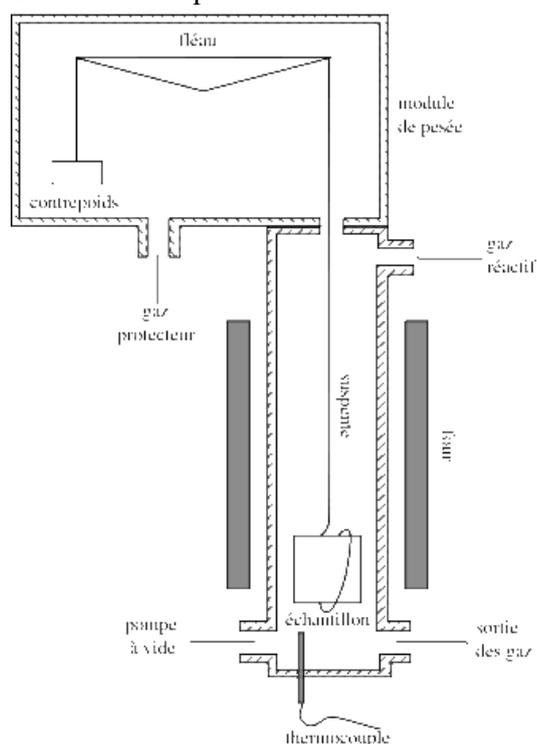


Fig.II.5 : Dispositif d'analyse thermogravimétrique (Source Web, Wikipedia)

L'ATG est réalisée sous azote afin d'éviter l'oxydation des produits (Gartner & al. 2010). Les résidus secondaires produits sous azote sont carbonés tandis que l'oxygène produit des gaz simples (Aggarwal et Dollimore, 1998).

III.5. L'analyse élémentaire

L'objectif de l'analyse élémentaire est de déterminer les proportions massiques de chaque élément organique d'un produit. Cette analyse peut être utilisée pour caractériser un produit, notamment la chitine et ses dérivés. Schimmelmann (2011) a largement étudié les proportions de carbone, d'azote et d'oxygène dans de nombreux arthropodes, terrestres et marins, dans différents écosystèmes. La répartition varie selon l'origine et les caractéristiques de la source.

Plusieurs dispositifs existent, celui utilisé dans cette étude est un analyseur élémentaire de type Flash EA 1112 NC (Interscience, Pays-Bas). Son principe repose sur une analyse chromatographique des gaz produits par une combustion de l'échantillon à très haute température. Chaque atome, par réactions d'oxydoréductions en présence de catalyseur, est libéré sous forme moléculaire unique et analysé par un détecteur TCD. Les échantillons sont introduits dans un passeur d'échantillon automatique MAS 200R. La programmation et l'enregistrement des résultats sont entièrement contrôlés par le logiciel Eager 300. La prise d'essai est de 1 à 3 mg d'échantillon sec. Elle est pesée dans une micro-coupelle en étain, placées en étuve à 70 °C une nuit, avant l'analyse.

III.6. Colorimétrie

L'intensité de la coloration des produits obtenus a été observée par un spectrocolorimètre CM-2500d, de source de lumière D65, à 10 °C (Konica Minolta). La calibration repose sur le blanc et le noir. D'après les recommandations de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE, 1976) les facteurs de réflexions L^* , a^* et b^* sont mesurés de 400 à 700 nm. L^* traduit la clarté de la lumière ($L^* = 0$ pour le noir et $L^* = 100$ pour le blanc). Les valeurs a^* et b^* indiquent respectivement l'intensité vers le rouge et de jaunes lorsqu'elles sont positives et vers le vert et le bleu lorsqu'elles sont négatives (Valente et al. 2011). Le facteur WI indique également l'intensité vers le blanc.

IV. Application, comparaison et sélection des méthodes

La littérature propose de nombreuses méthodes pour mesurer le degré de pureté en chitine et son degré d'acétylation. La majorité d'entre elles nécessitent une étape préalable de séparation de la chitine des protéines. Cette opération est délicate et des écarts de résultats sont observés en fonction des méthodes employées. Comparer et établir quelles sont les méthodes les plus pertinentes a été une priorité de ce travail de thèse. Pour cela, elles ont été appliquées à la matière première, aux produits commerciaux ou aux produits d'hydrolyse enzymatique.

IV.1. Composition de la matière première

Suite au séchage à froid de la matière première (Cf. I.1), la teneur en eau est comprise entre 10 et 20 %, quelle que soit la granulométrie des fragments. Pour la suite de l'étude, les teneurs de chaque composé, seront exprimées en pourcentage de produit sec.

La quantité de cendres, déterminée par l'incinération, varie de 19 % à 28 % (en poids sec), selon des lots de matière première. La moyenne est de $24,2 \pm 0,7$ %. Les teneurs en lipides et résidus glycosidiques totaux sont respectivement de $3,6 \pm 0,4$ % et $2,7 \pm 0,2$ %.

IV.1.1. Quantification des protéines

La teneur en protéines s'est distinguée par une très forte variation selon la méthode employée (Tab.II.5). La proportion de protéines est estimée à $36,7 \pm 0,1$ % ; $14,8 \pm 1,1$ % ; $30,3 \pm 4,0$ % et $42,9 \pm 2,9$ % par le dosage de Lowry, au BCA, par CPG et par la méthode Kjeldahl respectivement.

Méthodes	Lowry	BCA	CPG	Kjeldahl
Nb d'exp (en triplicat)	2	6	2	4
Moyenne \pm écart-type	$36,7 \pm 0,1$ %	$14,8 \pm 1,1$ %	$30,3 \pm 4,0$ %	$42,9 \pm 2,9$ %

Tab.II.5 : Résultats de la teneur en protéines – comparaison des méthodes

Lors de la description des méthodes, les limites de chacune ont été soulevées. Le dosage par Kjeldahl est indirect. Il doit tenir compte de l'estimation de la quantité de chitine et des coefficients de conversion entre la proportion d'azote associée aux protéines d'une part et à celle associée à la chitine d'autre part. Des interférences biaisent le dosage au BCA et dans une moindre mesure le dosage de Lowry. Enfin le dosage des acides aminés par CPG sous-estime la quantité de protéines totale car tous ne sont pas détectés par cette méthode. Cependant, il est possible d'estimer la proportion manquante par comparaison avec une méthode de référence.

Une analyse de la composition en acides aminés a été réalisée par un laboratoire extérieur, Lareal (Saint-Nolff, 56). Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus au laboratoire STBM (Tab II.6).

La méthode employée par le laboratoire Lareal ne détecte pas la quantité d'alanine, contrairement à celle du laboratoire STBM. Il faut également tenir compte des incertitudes liées aux mesures et à l'hétérogénéité de la matière première. L'écart-type atteint jusqu'à 4,0 g/100 g au laboratoire STBM et 0,2 g/100 g au laboratoire Lareal. Par conséquent, les différences de quantités en acides aminés observées entre les deux méthodes ne sont pas significatives.

Acides aminés	STBM		Lareal	
	g/100g (poids sec)	% (Σ acides aminés)	g/100g (poids sec)	% (Σ acides aminés)
Arginine	/	/	2,25	7,2
Alanine	3,05	10,1	/	/
Glycine	2,79	9,2	2,62	8,4
Valine	2,10	6,9	1,98	6,4
Leucine	2,45	8,1	1,98	6,4
Isoleucine	1,48	4,9	1,26	4,0
Thréonine	1,64	5,4	1,59	5,1
Sérine	1,16	3,8	1,87	6,9
Proline	2,57	8,5	2,32	7,4
Aspartique ac.	3,81	12,6	3,48	11,2
Méthionine	0,22	0,7	0,47	1,5
Glutamique ac.	5,26	17,4	4,56	14,6
Phénylalanine	2,40	7,9	1,94	6,2
Lysine	0,73	2,4	1,62	5,2
Histidine	0,00	0,0	0,90	2,9
Tyrosine	0,61	2,0	1,59	5,1
Cystéine	0,00	0,0	0,32	1,0
hydroxyproline	/	/	<0,2	0,6
Tryptophane	/	/	0,23	0,7
SOMME	30,27	100	31,18	100

Tab.II.6 : Composition en acides aminés dans la matière première – comparaison entre laboratoires

Au regard de la comparaison entre ces deux analyses (Tab.II.6 et Fig.II.6), chacune est incomplète. Le laboratoire Lareal quantifie mieux la cystéine et la méthionine (les acides aminés soufrés), le tryptophane, l'histidine et l'arginine, contrairement au laboratoire STBM. L'arginine représente plus de 7 % des acides aminés, tandis que les autres acides aminés précédemment cités sont moins présents, entre 1 et 3 %. À l'inverse, l'alanine n'est pas détectée par le laboratoire STBM, alors qu'elle représente près de 10 %. En complétant l'analyse de Lareal par les résultats du laboratoire STBM pour l'alanine, la somme d'acides aminés atteint 34,2 g/100 g. Cette quantité est encore sous-évaluée. Par exemple, les acides aminés soufrés ne supportent pas l'hydrolyse acide, un traitement par l'acide performique serait mieux adapté selon Armenta et Gueretto-Lagarreta (2009).

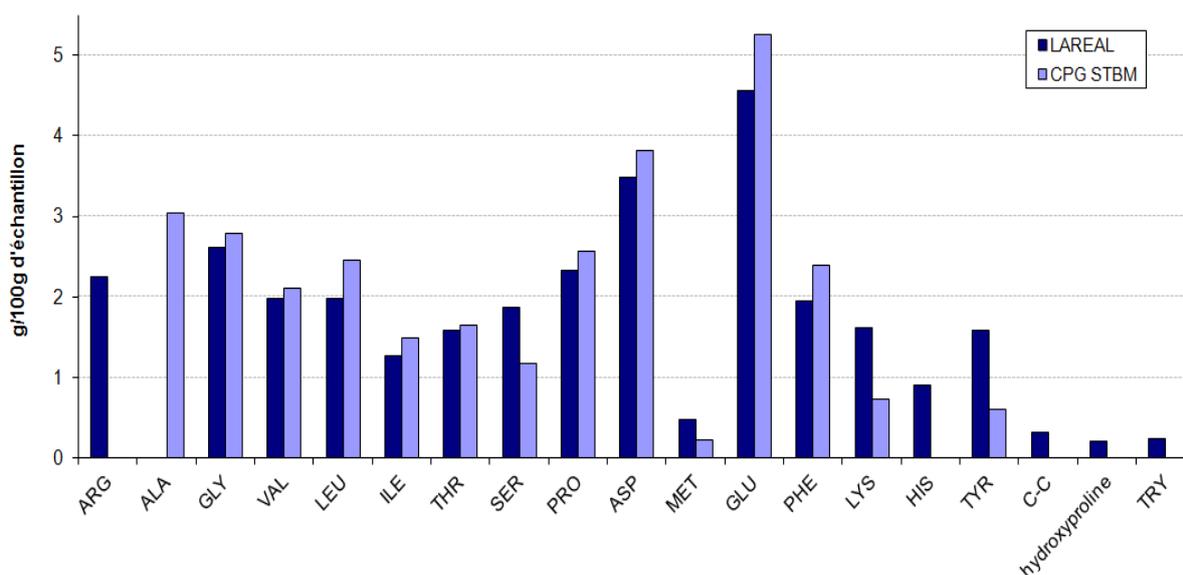


Fig.II.6 : Composition en acides aminés de l'exosquelette de crevette – comparaison par laboratoires

Le tableau II.6 et la figure II.6 illustrent les différences de quantité entre chaque acide aminé dans les exosquelettes de crevettes. L'acide glutamique et la glutamine regroupés, ainsi que

l'acide aspartique avec l'asparagine, sont majoritaires. La méthionine et la cystéine sont minoritaires, rappelons cependant que les deux méthodes les sous-estiment. Fall (2011) révèle la présence de 1,5 % de taurine et 0,2 % d'ornithine dans la chair de crevette nordique. Cependant, la composition dans les carapaces est différente. Armenta et Guerrero-Legarreta (2009) mesurent 2,0 % de taurine dans la carapace de *P. vannamei*.

Percot et al. (2003) déterminent également la composition en acides aminés de coproduits de crevettes *Parapenaeopsis stylifera*. Leurs mesures sont du même ordre de grandeur que la composition de l'exosquelette de *P. vannamei*, excepté pour la leucine et l'isoleucine.

Bien qu'il sous-estime la quantité de protéines, le dosage par la CPG est une méthode qui ne nécessite pas de séparation préalable de la chitine, contrairement aux autres méthodes. De plus, ce dosage ne subit pas interférences. Enfin, il apporte des informations complémentaires sur la nature des acides aminés qui composent la fraction protéique. Par conséquent, cette méthode est sélectionnée pour estimer la quantité de protéines à minima. En tenant compte de cette sous-estimation et des données de la littérature (Shahidi et Synowiecki, 1991 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2003 ; Valdez-Peña et al. 2010 ; Gartner et al. 2010), la proportion de protéines dans la matière première est estimée proche de 40 %. Ceci signifie qu'un facteur de conversion de 1,17 % relie le dosage par CPG à la valeur dite « réelle ».

IV.1.2. Caractérisation complète de la composition de la matière première

Pour déterminer la teneur en chitine, plusieurs méthodes ont été appliquées et comparées. Généralement, la méthode privilégiée est par la gravimétrie, grâce à l'extraction chimique. Ce protocole a fait l'objet d'une mise au point, afin de maximiser l'élimination des protéines et minéraux, tout en limitant la perte en chitine. Il est adapté spécifiquement aux exosquelettes de crevettes *P. vannamei*. Par cette méthode, la quantité de chitine se situe autour de 28,2 % (n = 3, chacun en triplicat). D'autres méthodes de quantification de la chitine seront décrites et appliquées aux produits d'hydrolyse enzymatique au cours des sections suivantes.

Le tableau II.7 synthétise et dresse la répartition de la composition de la matière première.

Constituants	Protéines	Chitine	Minéraux	Lipides	Oses totaux	C/N
Gamme	30 à 50 %	24 à 32 %	19 à 28 %	/	/	
Moyenne	40 %	28,2 %	24,7 %	3,6 %	2,7 %	4,3

Tab.II.7 : Composition globale des exosquelettes de crevette P. vannamei

Les compositions déterminées par des études similaires (Shahidi et al. 2003 ; Waldeck et al. 2006 ; Kurita, 2006) montrent également une grande variabilité des proportions. Elles varient en fonction des espèces, de l'âge, du genre et peuvent fluctuer en fonction des saisons et des conditions environnementales.

L'identification de la nature des minéraux et leur quantification n'a pas été nécessaire pour cette étude. Ces informations sont parfois évoquées (Percot et al. 2003 ; Cho et al. 1998). L'analyse élémentaire indique que l'élément majoritaire est le calcium (15,3 à 30,5 % en

poids sec), le second est le magnésium (1,0 à 2,0 %), le reste est constitué de traces de phosphore, sodium et potassium (Tolaimate, 2003).

Composition par catégorie de taille

Pour les besoins des expériences à suivre, les cuticules de crevettes sont broyées et triées par catégorie de taille. L'influence de la taille des fragments sur la composition de la matière première a été vérifiée. Deux tamis de 2,5 mm et 1 mm séparent les fragments. La figure II.7 présente la composition des fragments. Au regard de leurs variances, les compositions des deux catégories de taille de fragments ne sont pas significativement différentes. Toutefois, la part de minéraux semble plus élevée parmi les gros fragments. Pour cette catégorie, la variance est plus importante, tous composés confondus. Ceci s'explique du fait que le tamis de 2,5 mm retient des fragments plus hétérogènes.

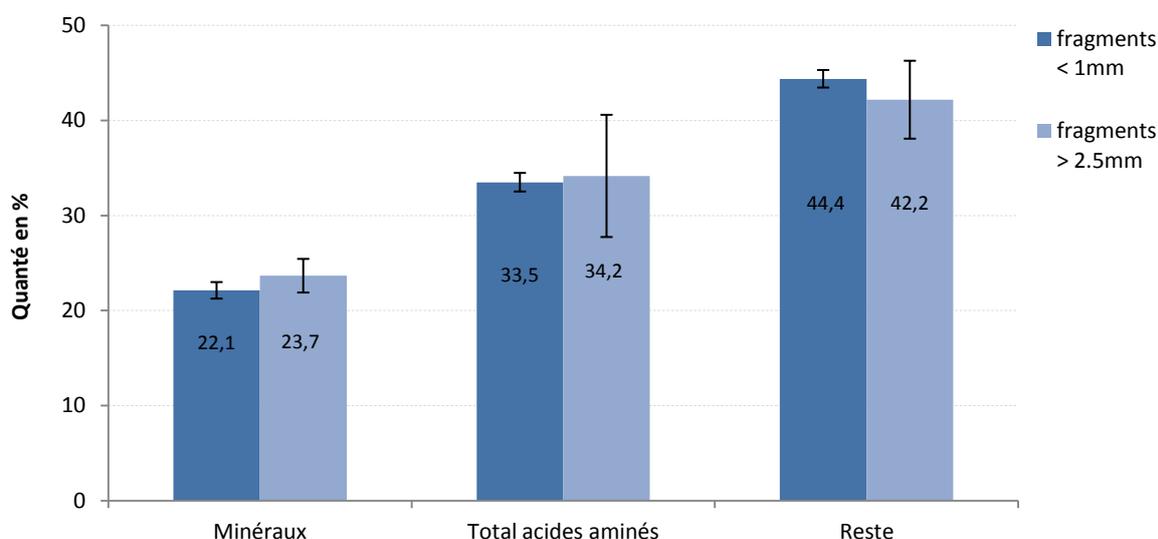


Fig.II.7 : Principaux composés présents dans la matière première en fonction de la catégorie de taille ($n > 3$)

Ces résultats ne remettent pas en cause la composition générale de la matière première. Bien que faibles par rapport à la moyenne en minéraux et en protéines, les proportions de ces échantillons respectent la gamme présentée dans le tableau II.7. Elles montrent également l'hétérogénéité du substrat, notamment pour les plus gros fragments.

IV.2. Composition des produits commerciaux

Les méthodes de caractérisation de la composition sont appliquées à la chitine commerciale, sur trois références différentes (Tab.II.8).

Fournisseurs	Extrait sec (%)	Cendres (%)	Protéines (%)	Osamines (%)	Couleur
France Chitine	96,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	70,7 ± 2,9	Crème
Sigma	95,3 ± 1,7	0,5 ± 0,4	0,2 ± 0,0	71,0 ± 5,7	Blanc
Mahtani	97,1 ± 0,3	4,2 ± 0,0	0,9 ± 0,1	/	Ivoire

Tab.II.8 : Comparaison des compositions de la chitine commerciale (% en poids sec)

Le tableau II.8 indique que la teneur en eau atteint jusqu'à 5 %, celle des protéines est inférieure à 1 % et celle des cendres varie d'un produit à l'autre. Le dosage des osamines, incluant la glucosamine qui constitue la chitine, a été testé pour estimer le taux de pureté du

polymère. Les teneurs mesurées se situent autour de 70 %. Ces résultats sont supérieurs aux rendements obtenus dans les travaux de Plassard et al. (1983) sur des ectomycorhizes¹⁶, dont les teneurs étaient comprises entre 50 et 60 %. Au contraire ces résultats sont inférieurs aux teneurs atteintes par Rao (1987), dont le rendement avoisine les 90 %. En effet, les études de Chen (1983) expliquent que l'hydrolyse acide occasionne la perte d'unité de NacGlu et Glu. Cette dégradation a été estimée entre 7 et 10 %. Bien que les produits analysés présentent une pureté de plus 95 %, les résultats des teneurs en osamines montrent une perte de plus de 10 %. De plus la reproductibilité de la technique s'est révélée peu précise. Par conséquent, ce dosage n'a pas été retenu pour estimer le taux de pureté.

IV.3. Composition des produits de l'extraction enzymatique

IV.3.1. Les résidus insolubles de la cinétique de référence

Afin d'expliquer la démarche méthodologique de caractérisation des produits d'hydrolyse enzymatique, nous prendrons comme exemple la cinétique d'extraction par 25 % de pepsine (par rapport à la quantité de protéine dans la matière première) à 40 ± 1 °C, 6 h en étuve.

La figure II.8 présente l'évolution au cours du temps des quantités résiduelles de minéraux et de protéines dans la fraction insoluble.

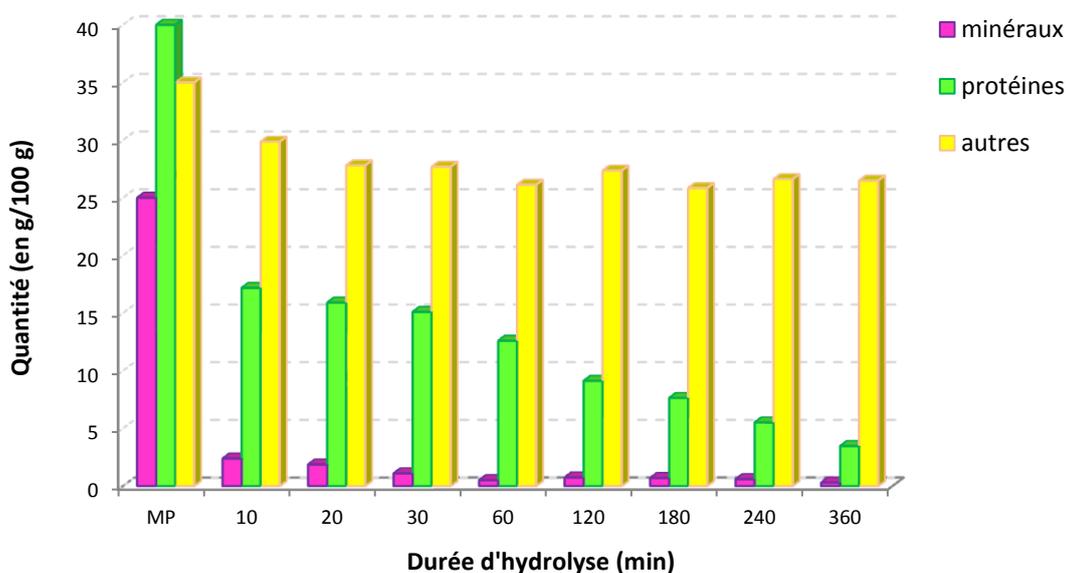


Fig.II.8 : Cinétique d'hydrolyse enzymatique (25 % de pepsine/prot – 40 °C – taille < 1mm)

Les cinétiques d'élimination des minéraux et des protéines sont mises en évidence. Le produit solide final, à 6 h d'hydrolyse, se caractérise par la présence de 3,5 g et 0,3 g (pour 100 g de produit) de protéines et minéraux résiduels respectivement. D'après la composition de la matière première en protéines et en minéraux, leur degré d'élimination atteint respectivement 91 % et 99 %. La cinétique de déminéralisation semble plus rapide que la cinétique de déprotéinisation (Cf. Chapitre 3). Pour estimer la quantité de chitine, deux méthodes sont comparées :

¹⁶ Association symbiotique entre champignons et racines de plantes

(a) d'après le bilan massique. Si la partie insoluble est composée uniquement de protéines, de minéraux et de chitine. Dès lors que les quantités de protéines et de minéraux sont connues, celle de la chitine peut être déduite. Cette méthode est valable en considérant que la quantité des autres composés (les glucolipides, glycoprotéines ou lipides résiduels) est négligeable. La partie « autres » de la figure II.8 équivaut alors à la quantité de chitine dans le produit. Cependant, le graphique montre que l'hypothèse n'est pas valable pour les durées courtes d'hydrolyse. L'évolution de la teneur en lipides est difficile à suivre en raison de leurs faibles quantités par rapport à l'importance de l'écart-type. Dès 10 min d'hydrolyse, la teneur en lipide dans le résidu solide est de 1,8 % et elle atteint, jusqu'à $0,6 \pm 0,4$ % pour le produit de 6 h d'hydrolyse. La littérature rapporte que les pigments résiduels sont très difficiles à séparer (Percot et al. 2003a). Concernant les résidus glycosidiques, du fait de leur taille, ils sont rapidement éliminés suite au rinçage et la filtration. Ils n'interfèrent donc pas dans cette méthode. La question se pose davantage pour les glycoprotéines. Au regard de la figure II.8, la part des « autres » composés se stabilise à partir de 60 min d'hydrolyse. Avant cette durée, la composition du résidu solide semble être trop riche en impuretés. La méthode s'appliquerait donc aux produits au-delà de 60 min d'hydrolyse et serait d'autant plus légitime à mesure que la durée augmente.

(b) la purification par « lavage » au NaOH. Le principe de cette technique repose sur l'extraction chimique en considérant que les impuretés majoritaires sont les protéines. L'étape de déprotéinisation chimique est appliquée. Un volume 10 fois supérieur de NaOH 1,25 N est ajouté à l'échantillon dans un tube placé 1 h à 90 °C. D'après la figure II.8, les protéines sont effectivement les impuretés majoritaires. Cependant, les minéraux sont présents en moindre mesure. Pour ces produits, la teneur en minéraux est comprise entre 4,8 et 0,9 %. La perte en minéraux après le traitement au NaOH est de 29 ± 1 %. La teneur résiduelle en minéraux dans les produits « nettoyés » est donc comprise entre 1,4 et 0,4 %. Comme la méthode précédente, celle-ci est donc davantage légitime lorsque les produits contiennent peu d'impuretés, c'est-à-dire pour les produits issus de plus longues durées d'hydrolyse.

La description de ces deux méthodes met en évidence leur limite vis-à-vis de la composition des produits. Pour les produits les moins hydrolysés, donc moins purs, l'estimation de la quantité de chitine est biaisée. D'autres méthodes sont donc requises pour suivre l'évolution du degré de pureté.

IV.4. Estimation du degré de pureté

IV.4.1. Recoupement par l'analyse élémentaire

(a) Méthodes de quantification de la chitine et des protéines

À partir de l'analyse élémentaire, nous disposons des teneurs en azote (N_t) et en carbone (C_t). Le rapport C/N est un indicateur courant pour caractériser les produits, à ce titre il figure sur les fiches techniques des dérivés de chitine commerciale. La formule de la chitine pure est définie par $(C_8H_{13}NO_5)_n$. Les proportions de carbone et d'azote sont donc de 47,3 % et 6,89 % respectivement (pourcentages massiques). Par conséquent, le rapport C/N de la chitine pure vaut 6,86 et celui du chitosan de 5,33.

Les cuticules de crustacés sont riches en azote, issu à la fois des protéines, de la chitine et de ses dérivés. L'analyse élémentaire et les méthodes de type Kjeldahl mesurent l'azote total sans distinguer l'azote associé aux dérivés de la chitine (N_q) de celui associé aux protéines (N_p). L'azote total (N_t) peut être exprimé selon l'équation II.17 :

$$N_t = N_p + N_q \quad (\text{II.17})$$

Les résidus solides issus de l'hydrolyse enzymatique sont composés de chitine (Q), protéines (P) et du reste (K), c'est-à-dire des lipides (L), des matières inorganiques (I) et de l'eau (W). L'écriture en teneurs relatives dans ses produits s'écrit (II.18) :

$$100 = Q + P + K \quad (\text{II.18})$$

(où $K = L + I + W$)

Les facteurs de conversion entre l'azote d'un composé et la quantité dudit composé sont notés C_q et C_p pour la chitine et les protéines respectivement. Il est donc possible d'utiliser l'expression II.19 :

$$Q = N_q * C_q \quad (\text{II.19})$$

dans II.17 :

$$N_t = P / C_p + Q / C_q$$

et d'en déduire :

$$Q = \frac{(N_t C_p + K - 100) * C_q}{C_p - C_q} \quad (\text{II.20})$$

La même approche est appliquée aux protéines :

$$P = \frac{(N_t C_q + K - 100) * C_p}{C_q - C_p} \quad (\text{II.21})$$

Ces équations sont utilisées par Diaz-Rojas et al. (2006) pour déterminer les teneurs en chitine et en protéines. Une précaution doit être prise concernant C_q et C_p qui varient respectivement en fonction du degré d'acétylation et de la nature des produits. C_q est compris entre 14,5 (produit 100 % acétylé) et 12,1 (produit 100 % désacétylé). Généralement, le facteur de conversion des protéines, C_p , est de 6,25. Cependant des études montrent qu'il ne convient pas à tous les produits, notamment aux produits marins, riches en azote (Gnaiger et Bitterlich, 2001 ; Diaz-Rojas et al. 2006). Le facteur proposé pour les animaux aquatiques, les algues et bactéries est alors de 5,8. D'autres facteurs de conversion sont également présentés, tels que 5,51 ; 3,59 ; 5,64 ; 3,24 pour les végétaux. Pour les macroalgues, le facteur de conversion évoluerait de 3,75 à 5,72 (Gonzalez Lopez et al. 2010). La figure II.9 illustre la part d'azote dans la chitine et les protéines, en tenant compte des variations de C_q et C_p . Pour C_p , l'écart étudié se limite de 6,25 à 5,8 (Diaz-Rojas et al. 2006).

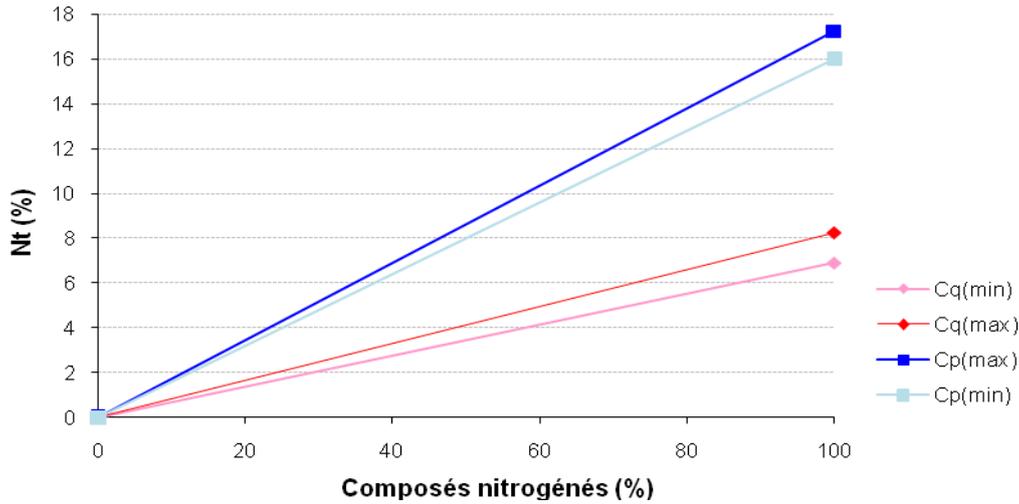


Fig.II.9 : Variations de teneur en azote pour différents composés azotés (P et Q)

Pour un produit composé uniquement de chitine et de protéines ($K = 0$), les équations II.20 et II.21 sont simplifiées. L'azote total, en respectant la stœchiométrie, est réparti entre celui de la chitine et celui des protéines. Les teneurs des deux composés, peuvent alors être déduites de la mesure de l'azote total (Fig.II.10) :

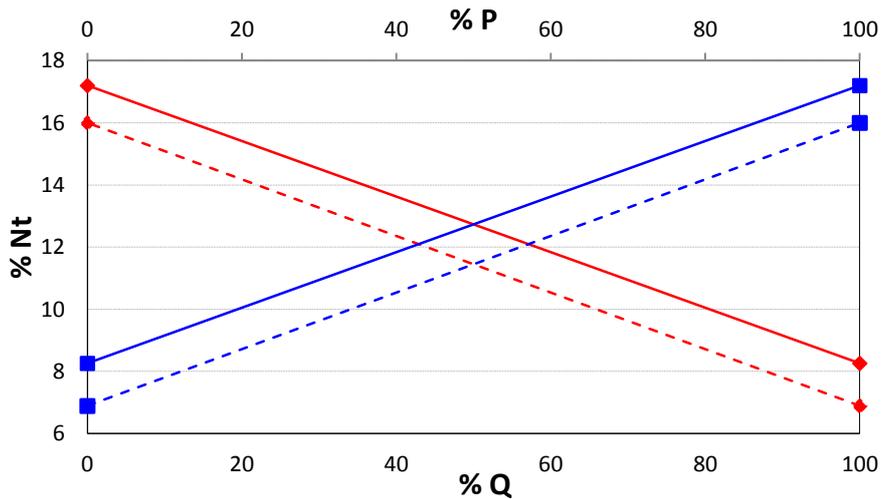


Fig.II.10 : Pourcentage de chitine (Q) et de protéines (P), minimal (---) et maximal (-) en fonction de Nt

Les proportions de chitine et de protéines varient entre les droites représentées sur la figure II.10, selon les variations de C_q et C_p . Ceci est valable uniquement lorsque K est nul. Pour ces écarts de C_q et C_p , l'erreur associée aux proportions de chitine et de protéines peut atteindre 14 %. Cette approche est utilisée par Diaz-Rojas et al (2006) qui fait l'hypothèse de se conformer aux C_q et C_p classiques, 14,51 et 6,25 respectivement. Dans ce cas, deux droites uniquement demeurent sur la figure II.10, l'une réciproque de l'autre, dont les équations permettent de déterminer la teneur en chitine et en protéines (II.22) :

$$N_t = -0,091*Q + 16 \quad \text{et} \quad N_t = 0,091*P + 6,89 \quad (\text{II.22})$$

La même expression sous sa forme littérale et qui tient compte de la présence d'impuretés est également développée (II.23) :

$$N_t = - \frac{(C_q - C_p)}{C_q C_p} Q + \frac{1}{C_p} (100 - K) \quad \text{et} \quad N_t = \frac{(C_q - C_p)}{C_q C_p} Q + \frac{1}{C_q} (100 - K) \quad (\text{II.23})$$

La relation II.23 est appliquée aux produits de la cinétique de référence (hydrolyse par 25 % de pepsine/protéines à 40 °C), à partir des mesures de N_t fournies par l'analyse élémentaire. La quantité de chitine ainsi obtenue est ensuite comparée à celles déterminées par le lavage au NaOH et par le bilan massique (Fig.II.11).

Sur le même principe, la relation II.23 devrait être affinée en précisant davantage les facteurs C_q et C_p . Par exemple, le facteur C_q peut être confirmé par la détermination du degré d'acétylation et C_p peut être précisé par une analyse complète des acides aminés. En effet, la teneur en azote N_p peut être déterminée via le dosage par CPG, qui fournit la proportion de chaque acide aminé. Par connaissance de la composition élémentaire de chaque acide aminé, la proportion en azote protéique peut être établie. La teneur en azote total, N_t , étant donnée par l'analyse élémentaire, il est possible d'en déduire, par différence entre N_t et N_p , la quantité en azote N_q . Enfin, on peut déduire la quantité de chitine Q (via $C_q = 14,51$, car le DA tend vers 100 %). Une nouvelle équation est donc établie et également comparée aux précédentes méthodes (Fig.II.11).

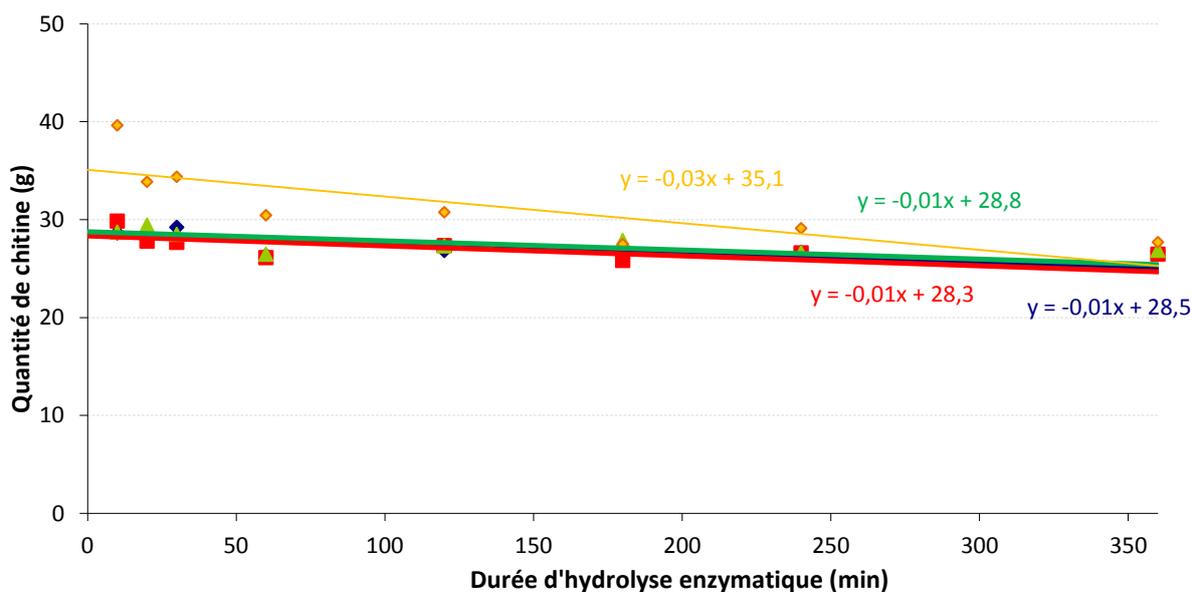


Fig.II.11 : Comparaison des méthodes de quantification de la chitine (en rouge, via le bilan massique ; en bleu, via le lavage au NaOH ; en vert, via l'analyse élémentaire ; en orange, via le C_p déterminé par CPG)

La figure II.11 montre trois droites de tendance proches, celles qui correspondent aux trois premières méthodes décrites, via le bilan massique, le traitement chimique et l'analyse élémentaire (respectivement rouge, bleu et vert). Au regard de la figure II.12, la corrélation entre les méthodes est importante car les coefficients R^2 sont compris entre 0,77 et 0,91. De plus, la pente des trois droites est proche de 1 (Fig.II.12).

Par ailleurs, ces trois méthodes s'accordent sur une évolution de la quantité de chitine qui varie de près de 28,5 g/100 g à environ 23 g/100 g après 6 h d'hydrolyse enzymatique (Fig.II.11).

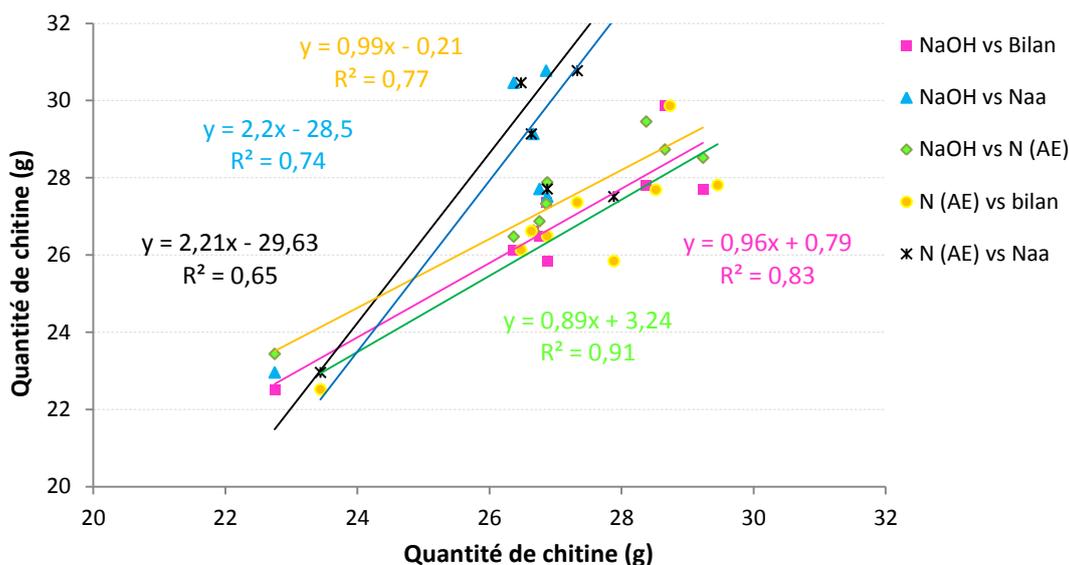


Fig.II.12 : Corrélation entre les méthodes de quantification de la chitine (NaOH= via le traitement chimique, Bilan = via le bilan massique, N (AE) = via l'analyse élémentaire, Naa = via la composition en acides aminés)

Pour la dernière méthode, qui exploite à la fois l'analyse élémentaire et la composition en acides aminés pour déterminer précisément le facteur C_p , la quantité de chitine est illustrée en orange. La droite de tendance se démarque par des mesures supérieures aux autres méthodes. La corrélation avec les autres méthodes est plus médiocre (Fig.II.12). Soulignons que cette méthode est plus sensible que les autres. En effet, elle repose sur le calcul de la teneur en azote protéique associé à la quantité de chaque acide aminé. Par conséquent, l'écart-type de chaque mesure d'acide aminé par CPG s'accumule. De plus, l'ensemble des acides aminés n'est pas dosé par la CPG (Cf. section, IV.1.1). Par exemple, l'arginine est absente, ainsi que le tryptophane. De plus, l'acide aspartique et glutamique sont respectivement réunis avec l'arginine et la glutamine, alors que leur composition élémentaire est différente. Ceci entraîne un défaut d'estimation du N_p qui se répercute sur N_q .

Pour conclure, on retiendra que le traitement chimique au NaOH, le bilan massique et l'analyse élémentaire semblent être des méthodes assez bien adaptées pour estimer la quantité de chitine. Néanmoins, d'autres exemples, non présentés ici, ont montré de plus fortes disparités (Cf. Chapitre 3, IV.3.1) Il convient donc d'être prudent, notamment lorsque les produits sont les moins purifiés.

Enfin, l'évolution des droites de la figure II.11 suggère une faible perte de chitine liée à l'augmentation de la durée d'hydrolyse enzymatique ($\approx 10\%$ en 6 h). Ce phénomène sera étudié de façon plus approfondie dans le chapitre 4 (section IV.3).

(b) Méthodes indirectes d'estimation de la pureté en chitine

Le rapport C/N constitue un indicateur complémentaire qui présente l'avantage d'estomper l'éventuelle hétérogénéité de la composition des produits en s'affranchissant des impuretés (si elles ne comportent ni carbone, ni azote). Le rapport C/N des protéines est théoriquement compris entre 0,7 et 8,5, tandis que celui de la chitine pure est de 6,9, puis tend vers 5,3 lors

qu'elle est convertie en chitosan. Donc, la gamme des rapports C/N des protéines couvre celle des dérivés de la chitine. Cependant une tendance peut être observée au fur et à mesure de l'hydrolyse par la pepsine (Fig.II.13) :

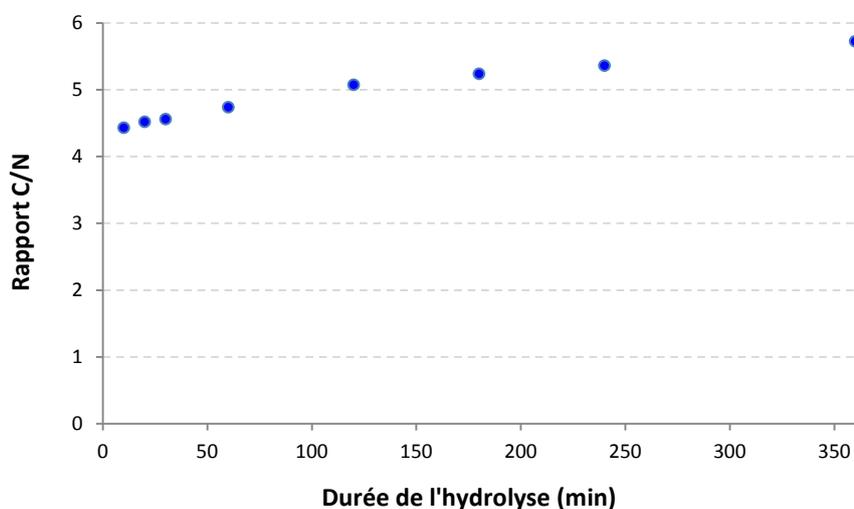


Fig.II.13: Evolution du rapport C/N en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique (25 % pepsine, 40 °C)

La figure II.13 dévoile une augmentation du rapport C/N à mesure que l'hydrolyse progresse. Les valeurs de la cinétique atteignent 5,73 à 6 h et tendent vers 6. À la fin de la réaction, le rapport C/N est inférieur à celui de la chitine pure. Ce rapport correspond aussi bien à celui d'un chitosan que d'un mélange de chitine et de protéines. Cependant, il est davantage conforme aux objectifs.

IV.4.2. Recoupement par l'analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique est appliquée aux produits d'hydrolyse enzymatique comme outil de caractérisation. Cette approche originale se base sur les différences de comportements thermiques des principaux constituants des carapaces de crevettes. L'objectif de cette partie de l'étude est de comparer l'ATG avec les méthodes d'estimation de la quantité de chitine et du degré de pureté. L'augmentation de la température entraîne des modifications de la structure des molécules et des pertes de masse, associées à leur volatilisation. Chaque composé est caractérisé par une stabilité thermique spécifique, il peut donc être identifié. Les principaux composés rencontrés dans nos produits sont l'eau, les minéraux, les protéines et la chitine.

- l'eau s'évapore entre la température ambiante et 105 °C. L'élimination complète et rapide de l'eau nécessite une température plus élevée, environ 125 °C, à cause de fortes liaisons avec les autres composés ;
- les minéraux sont les plus résistants aux fortes températures, ils constituent une masse résiduelle lorsque l'ATG s'achève à 700 °C ;
- les polymères, tels que la chitine ou les protéines, se décomposent sur une large gamme de température en fonction de leur structure.

L'augmentation de la température conduit à des modifications de structure des composés

initialement présents dans le produit. Ceci conduit à la production de dérivés secondaires, eux-mêmes dégradés thermiquement à une température plus élevée. Aggarwal & Dollimore (1998) considèrent la décomposition des polymères en deux étapes. La première correspond à une combustion gazeuse flamboyante et la seconde à une combustion incandescente durant laquelle les résidus carbonés, issus de l'étape précédente, sont dégradés. Pour Marcilla et al. (2009) la première étape est dite de « dévolatilisation » car la décomposition des produits conduit à la production de matière volatile (dioxyde de carbone, hydrocarbures, oxyde de carbone, hydrogène). Tandis que l'étape suivante est la dégradation des dérivés secondaires carbonés solides. La première décomposition gazeuse serait associée à la décomposition des liaisons hydrogènes et des groupes C=O et C-N, suivie de la dépolymérisation thermique par dégradation des liaisons C-CO et condensation (Mosquera et al. 1994).

La dégradation des protéines se situerait à une température inférieure à celle de la dégradation de la chitine (Alonso et Vega, 1990 ; Zhou et al. 2010). Cependant, les auteurs ne sont pas unanimes sur la délimitation des plages de température de dégradation. Elles dépendent des caractéristiques des échantillons et des paramètres de mesure, tel que le type d'atmosphère dans l'appareil et la vitesse de montée en température. Zheng et al. (2003) montrent que les protéines de soja seules commencent à être dégradées à une température inférieure à celle de la chitine tandis que les mélanges chitine-protéines-glycérol (pour réaliser des bioplastiques) réagissent différemment. Protéines et chitines partagent certains groupes et des liaisons similaires, tels que les C=O et NH, ce qui peut expliquer une décomposition sur des plages thermiques communes.

Les travaux d'Alonso évoquent l'existence d'une seconde plage de dégradation thermique, entre 420 et 560 °C, qui correspondrait à la dégradation commune de composés secondaires de polysaccharides et de protéines (Alonso & Vega 1990). Amorim et al. (2004) montrent que les plages de dégradation de l'amidon et des protéines se chevauchent. Marcilla et al. (2009) évoquent des plages de dégradation thermique communes aux protéines et aux polysaccharides pariétaux des microalgues, tandis que les lipides seraient dégradés à une température plus élevée. Le tableau II.9 compare les plages de température de dégradation thermique des protéines et de la chitine, selon les auteurs :

	Élimination des protéines	Élimination de la chitine
Alonso, 1990	180 à 280 °C et 420 à 560 °C	280 et 360 °C
Gartner, 2010	Pic à 316 et 511 °C (papaïne)	Pic à 327 et 500 °C
Marcilla, 2009	180 à 400 °C et 400 à 760 °C	
Romano, 2007 ; Zhou, 2010	50 à 270 °C	270 et 600 °C

Tab II.9 : *Comparaison de plages de dégradation thermique de la chitine et des protéines selon les études*

Selon l'étude de Pawlak et Mucha (2003), la première étape de dégradation thermique du chitosan correspond à la formation de nouvelles liaisons intermoléculaires après la destruction de groupes amines. Ces nouvelles liaisons sont elles-mêmes dégradées lors de la seconde étape (Tang et al. 2005).

Quatre profils ATG appliqués à nos produits ont été comparés. Chacun est associé à une durée d'hydrolyse différente, et par conséquent à un degré de pureté différent. Ils sont nommés **MP**

la matière première, **P180** le produit d'hydrolyse de 180 min, **P360** le produit d'hydrolyse de 360 min et **PP** ce même produit purifié par lavage au NaOH.

Les profils ATG ont été obtenus par le programme suivant : tout d'abord, un palier de stabilisation thermique de 10 min a été appliqué à 125 °C, puis la température est élevée à vitesse constante de 1 °C/min. Une ultime étape de stabilisation thermique est enfin appliquée à 700 °C afin d'assurer l'élimination complète des composés organiques. La figure II.14 illustre les profils ATG des quatre produits de différents degrés de pureté et le tableau II.10 résume les caractéristiques de leurs comportements thermiques.

	MP (cuticule de crevettes)	P180 (180min)	P360 (360min)	PP (lavage chimique de P360)
1 ^{er} pic caractéristique	340 °C	295 °C	298 °C	315 °C
Plage 1 : masse perdue	42 %	56 %	60 %	70 %
Plage 1 : étendue T°	196 °C	130 °C	110 °C	98 °C
Plage 2 : masse perdue	28 %	42 %	38,50 %	29 %
Plage 2 : étendue T°	280 °C	272 °C	325 °C	370 °C
Plage 3 : masse perdue	10 %	/	/	/

Tab.II.10 : Caractéristiques des comportements thermiques des produits de différents degrés de pureté

Les plages de température de chaque étape sont délimitées par les flèches sur la figure II.14. Elles correspondent à une vitesse de perte de masse minimale liée à la fin d'un processus de dégradation. On considère le démarrage de la perte de masse lorsque le seuil de 99 % est dépassé.

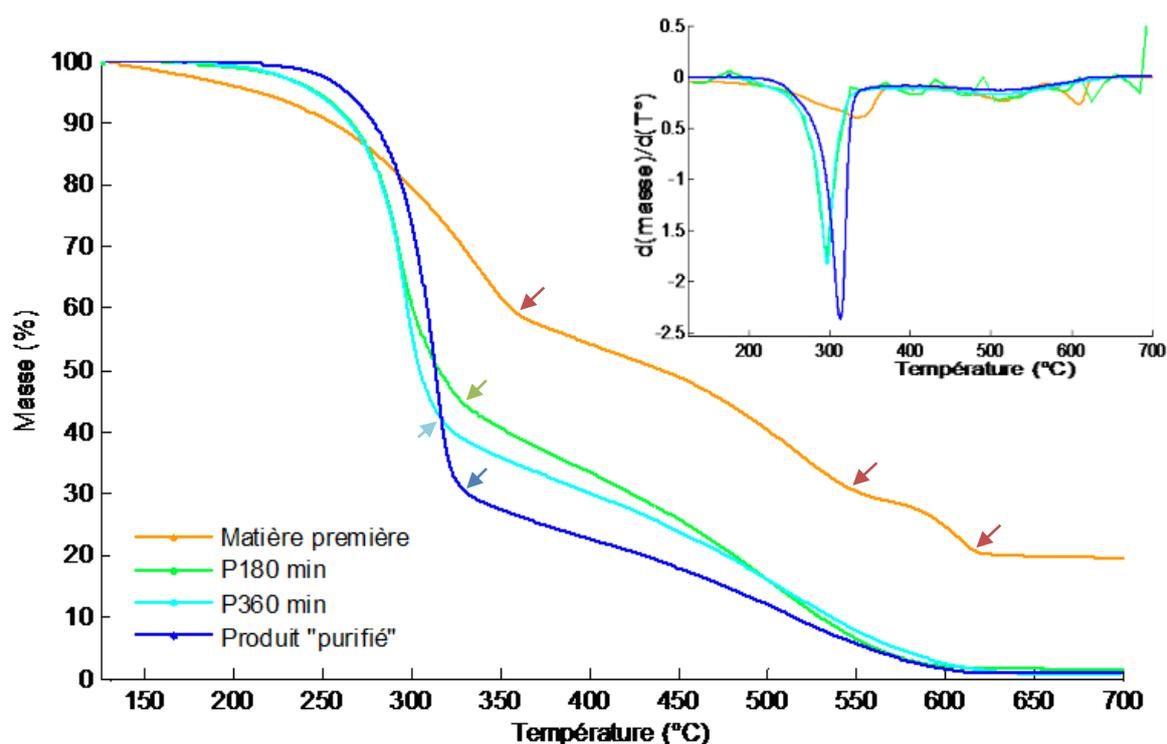


Fig.II.14 : Thermogramme de produits de différents degrés de pureté (1 °C/min)

Le comportement thermique général des quatre profils (Fig.II.14) montre un décalage des pics

de dégradation (TabII.10). La matière première présente trois pics à 340 °C, 525 °C et 613 °C. On peut distinguer trois étapes. Au cours de la première, le produit perd 42 % de sa matière, les protéines et la chitine sont dégradées en résidus secondaires. À la fin de l'étape suivante, autour de 550 °C, 28 % du poids est éliminé. La dernière étape s'achève vers 620 °C, température à laquelle il ne reste que les minéraux. Les 10 % de matière éliminée lors de la dernière étape correspondent probablement aux résidus secondaires des protéines. Cette ATG est similaire à celle décrite par Gartner et al. (2010), appliquée à la même matière première.

P180 et P360 présentent des pics à 295 °C et 298 °C respectivement. À la première étape, P180 perd 56 % de masse entre 200 et 330 °C, tandis que P360 en perd 60 % entre 207 et 317 °C. Le pic de dégradation thermique du produit PP se situe à 315 °C et 70 % du poids est éliminé entre 232 et 330 °C.

Les quatre profils ATG sont confrontés aux résultats préalablement acquis par l'analyse de la composition des produits. Le tableau II.11 décrit ces compositions. Le degré de pureté augmente de 30 % dans la cuticule de crevette (moyenne estimée à partir de 4 échantillons) à plus de 99 % dans le produit PP.

	MP (cuticule crevettes)	P180 (180 min)	P360 (360 min)	PP (lavage chimique de P360)
Résidus ATG (%)	19,6	1,7	1,3	1,0
Minéraux (%)	19-28	1,5	0,7	0,2
Protéines (%)*	30-50	16,5	10,3	0,3
D° de pureté (%)**	~ 30	82	93	99

Tab.II.11 : Composition des produits de différents degrés de pureté (estimation par *CPG, **lavage au NaOH)

Un décalage du démarrage de la première étape est observé. Elle commence dès 146 °C pour MP, à 200 °C et 207 °C pour P180 et P360 respectivement. La perte de matière du produit PP ne commence qu'à partir de 232 °C. On note que la température initiale de perte de masse est d'autant plus retardée que le produit est pauvre en protéines. Ce qui confirme les observations d'études antérieures (Alonso et Vega, 1990). Le tableau II.10 montre également que la plage de température de la première étape est d'autant plus courte que l'échantillon est pauvre en protéines, tandis que la quantité de matière éliminée lors de cette étape augmente. La figure II.15 représente les mesures des quantités de masse perdues à la première étape en fonction des quantités de protéines dans l'échantillon.

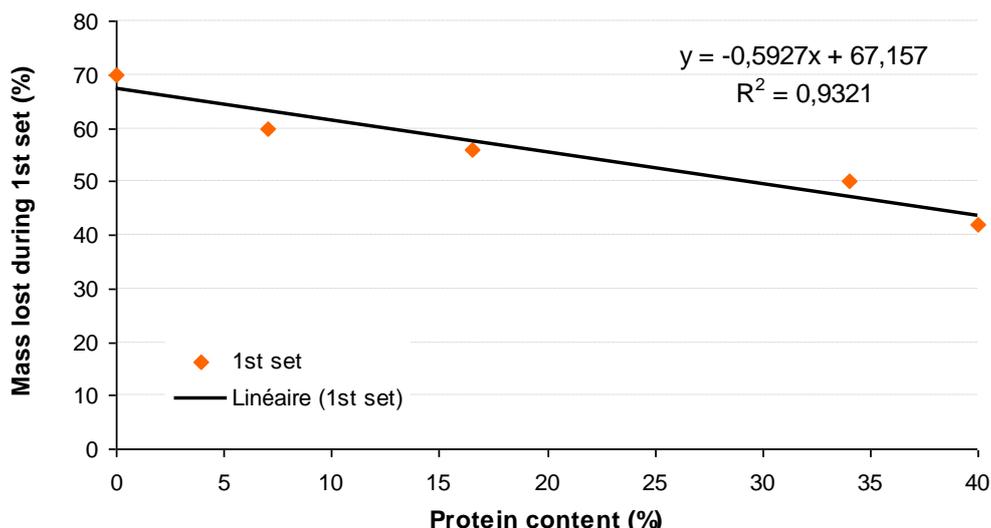


Fig.II.15 : Relation entre la perte de masse de la 1^{ère} étape et la quantité de protéines

Un autre produit a été ajouté, il s'agit de P30 (34 % de protéines après 30 min d'hydrolyse). Une régression linéaire décrit convenablement, sur le domaine observé, le lien entre la quantité de masse perdue lors de la première étape et la quantité de protéines dans l'échantillon. Compte tenu des incertitudes de mesures liées à l'hétérogénéité des produits, le R² observé, de 0,93, est satisfaisant. La première étape est donc fortement liée à la décomposition d'une partie des protéines en dérivés carbonés secondaires.

Un lien est établi entre la plage de température de la première étape de décomposition, la quantité de protéines et l'estimation du taux de pureté par lavage au NaOH (Fig.II.16).

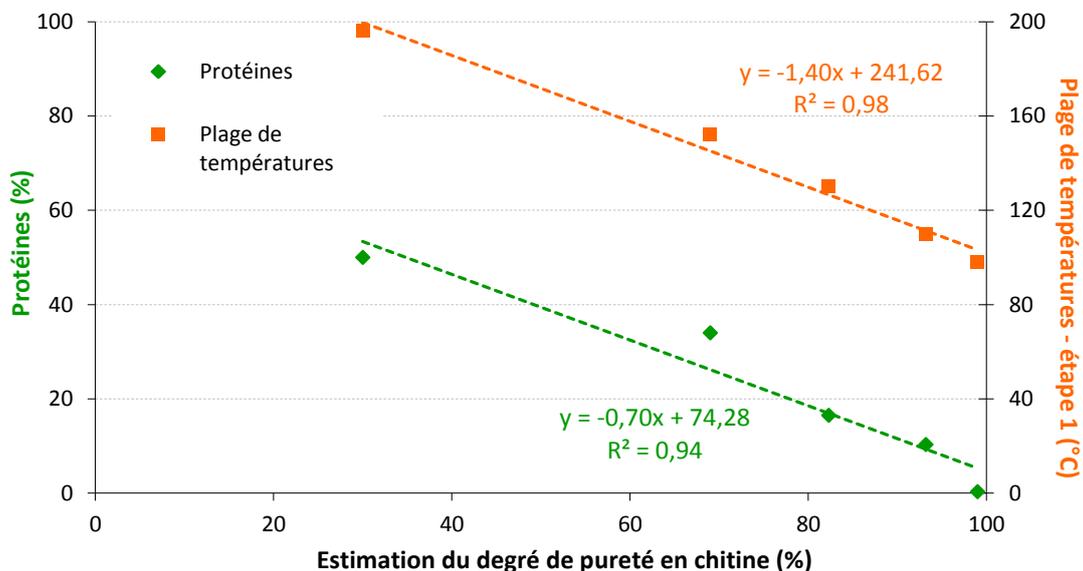


Fig.II.16 : Relation entre l'estimation du taux de pureté et la quantité de protéines résiduelles d'une part et l'étendue de la première plage de température de décomposition d'autre part

D'une part, l'estimation du degré de pureté, via le traitement chimique des produits, repose précisément sur l'élimination des protéines. On retrouve donc une corrélation linéaire élevée entre le degré de pureté et la quantité de protéines résiduelles. D'autre part, une bonne

corrélation linéaire est également observée entre le degré de pureté et l'étendue de la plage de décomposition thermique de la première étape. La présence de protéines résiduelles allonge cette étape de décomposition thermique.

L'ATG ne permet pas la quantification directe des protéines et de la chitine. Un modèle pourrait être envisagé pour déterminer la quantité de protéines à partir de l'étendue de la première plage de dégradation thermique. Cependant il devra alors tenir compte d'autres paramètres, tels que le DA et DP, qui modifient certainement les comportements thermiques des polymères. En revanche, l'ATG se révèle être un bon outil pour comparer la présence ou non de protéines entre deux échantillons de chitine.

IV.4.3. Recouplement par RMN et FT-IR

(a) Résonance magnétique nucléaire

Des mesures de RMN en ^{13}C sont effectuées à l'INRA de Nantes (plateforme BIBS), à la fois sur la chitine commerciale, considérée comme pure (< 1 %), et la matière première. Le degré d'impuretés a été étudié selon deux méthodes. La première a consisté à superposer les spectres de RMN (Fig.II.17) et à déterminer le facteur de conversion entre les deux spectres (en tenant compte de la différence de masse des prises d'essais). La seconde repose sur le rapport entre les intégrations des signaux du carbone CO, à 173,7 ppm, de la chitine commerciale et du produit d'hydrolyse.

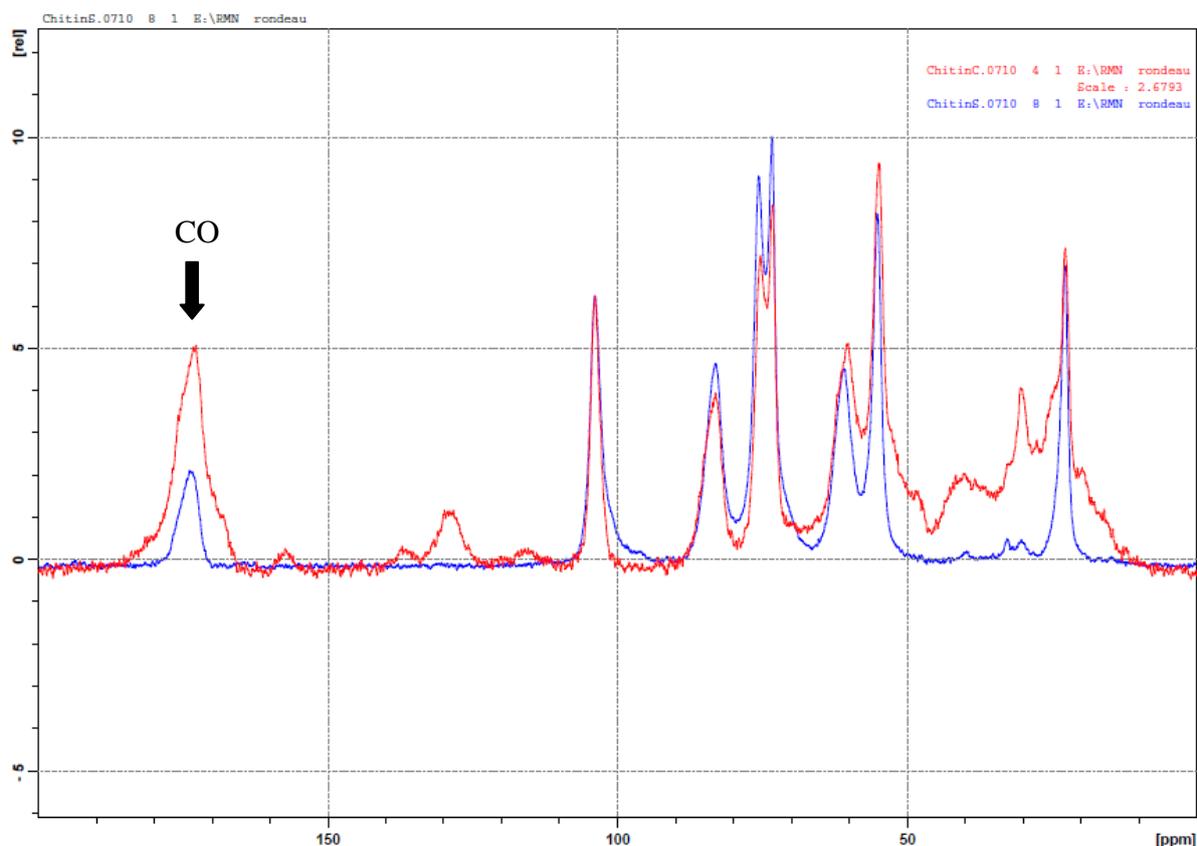


Fig.II.17 : Superposition des spectres RMN ^{13}C de la chitine commerciale (Sigma), en bleu, et de la matière première, en rouge

Appliqué à l'exosquelette de crevettes, les résultats obtenus sont de 68 % et 60 % pour la première et la seconde méthode respectivement. L'erreur est de 2,4 % (rapport signal/bruit). La méthode d'analyse de la composition a indiqué précédemment un degré d'impuretés de près de 70 % (Cf. Tab.II.7). La première méthode via la RMN ^{13}C , qui repose sur la différence entre les deux aires, semble donc convenir davantage. La seconde méthode peut être perturbée par la présence des CO de la chitine.

(b) Spectroscopie FT-IR

La même approche a été appliquée par la spectroscopie FT-IR, pour comparer la chitine commerciale (Sigma), la chitine obtenue par voie chimique et celle obtenue par voie enzymatique. La différence d'aire est calculée entre la référence commerciale et les deux autres.

La figure II.18 montre les spectres de FTIR de la chitine commerciale (en bleu), de la chitine obtenue par voie chimique (en rouge) et de celle obtenue par voie enzymatique (en vert).

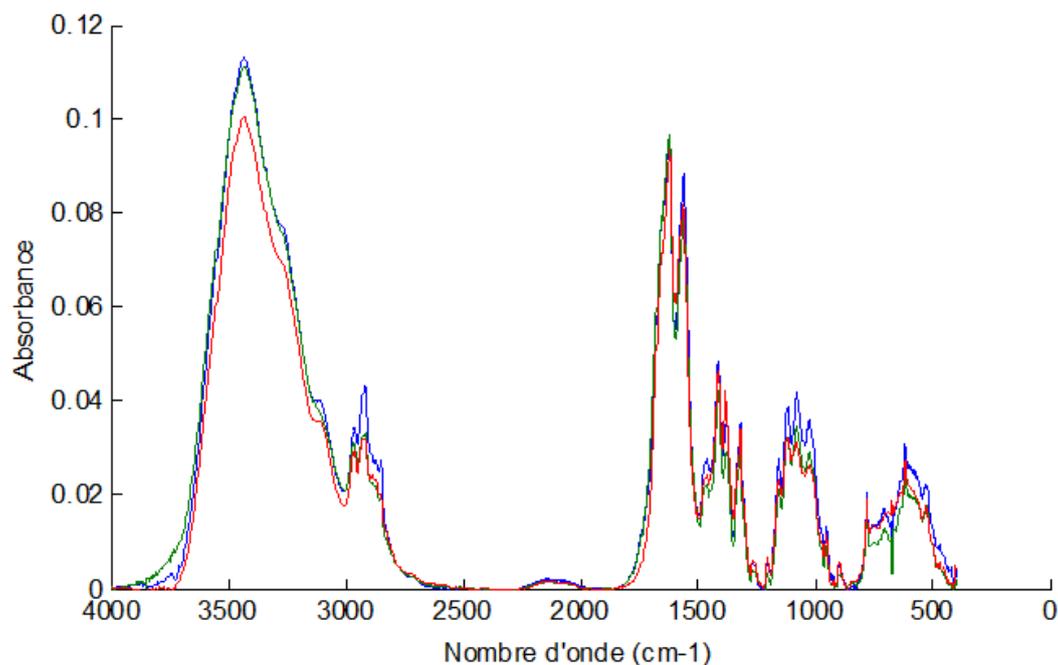


Fig.II.18 : Spectres de spectroscopie FT-IR de la chitine commerciale Sigma (en bleu), extraite par voie chimique (en rouge) et enzymatique (en vert) au laboratoire.

Au regard de la figure II.18, il semblerait que la chitine extraite par voie enzymatique soit plus pure que celle obtenue par voie chimique tant les similarités sont importantes avec la référence commerciale. Cependant, les résultats de l'analyse de leur composition démontrent le contraire puisque le produit extrait contient moins de 1 % de protéines et de minéraux tandis que celui extrait par voie chimique n'atteignait pas ce niveau de pureté (à peine 60 % de degré de pureté estimé à partir du nettoyage chimique). La présence de protéines dans l'échantillon provoque une augmentation d'intensité d'absorbance à des pics communs à la chitine, notamment entre 2 800 et 3 500 cm^{-1} .

Le rapport des aires par rapport au profil de la chitine commerciale, indiquerait le degré de pureté en chitine. D'après cette méthode, la chitine extraite par voie chimique serait pure à 87,3 % et celle extraite par voie enzymatique à 94,7 %. Ces résultats ne concordent pas avec l'analyse de la composition, ni avec les résultats obtenus via la RMN ¹H.

L'inconvénient majeur de la spectroscopie FTIR apparaît lorsque des protéines résiduelles sont présentes dans l'échantillon. Elles présentent des groupes en communs avec la chitine. Falini et al. (2003) mettent en évidence les bandes spécifiques aux protéines et à la chitine qui se chevauchent. Par ailleurs, dans son étude, Furuhashi et al. (2009) ont comparé les spectres de protéines pures (la BSA), un mannane et un glucane pur comme polysaccharides. Enfin, ces standards sont comparés à la chitine d'exosquelette de crabe. Ils montrent que les bandes caractéristiques de la chitine coïncident à la fois avec celles des oses et des protéines. Paulino et al. (2006) montrent que certains rendements d'apparence élevés, étaient dus à la présence d'impuretés résiduelles, visibles par FT-IR. Les protéines provoquent donc des interférences et biaisent l'estimation du degré de pureté en chitine.

IV.5. Estimation du degré d'acétylation

(a) Résonance magnétique nucléaire

Les RMN du solide en ¹³C et ¹⁵N sont parfois utilisées pour déterminer le degré d'acétylation (Kasaai, 2010). En ¹³C, elle identifie 8 signaux qui correspondent aux 8 carbones de la chitine et du chitosan (Tab.II.2). La seule différence entre la chitine et le chitosan étant située au niveau du N-CH₃, le DA est calculé de la façon suivante :

$$DA = 100 \times I_{N-CH_3} / [1/6(I_{C1} + I_{C2} + I_{C3} + I_{C4} + I_{C5} + I_{C6})] \quad (II.24)$$

$$DA = 100 \times I_{N-CH_3} / [1/6 \sum I_{\text{principales chaines carbones}}]$$

En ¹⁵N, les spectres ne présentent qu'un seul signal, directement lié au degré d'acétylation.

$$DA = (I_{N\text{-acétyl}}) / (I_{N\text{-acétyl}} + I_{\text{amine}}) \quad (II.25)$$

Les spectres en ¹⁵N de la matière première et du produit d'hydrolyse sont présentés en figure II.19.

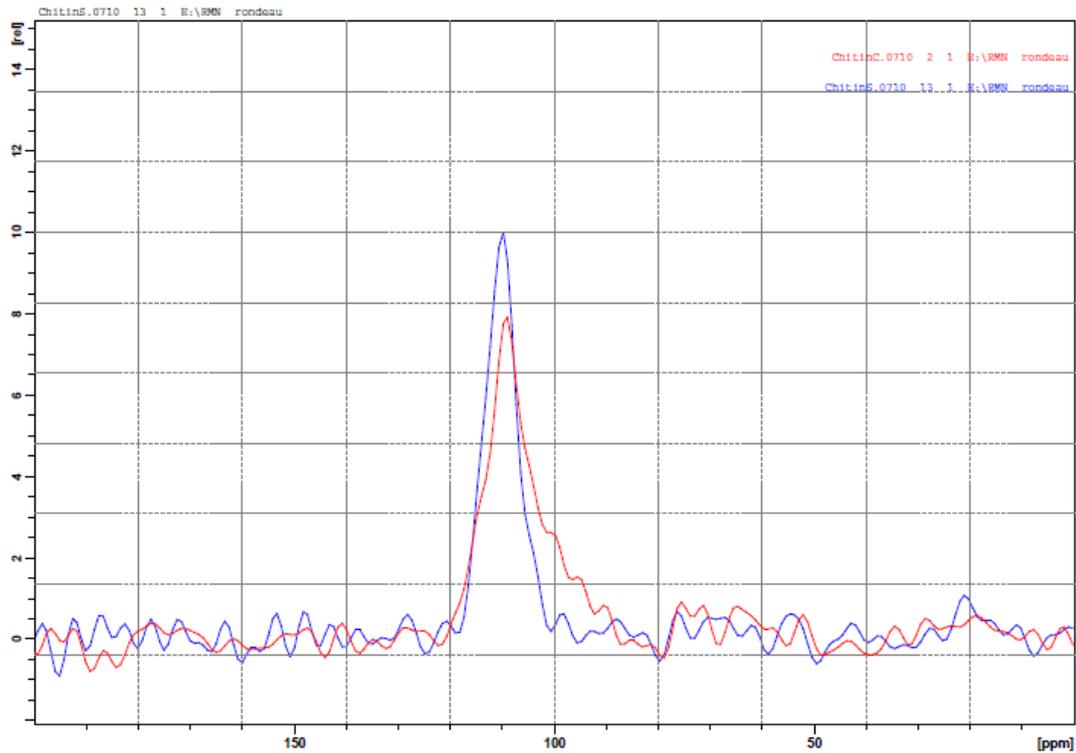


Fig.II.19 : Superposition des spectres RMN ^{13}C de la chitine commerciale (Sigma), en bleu, et de la matière première, en rouge

Le degré d'acétylation obtenu est de $65,0 \pm 5,3 \%$. Par cette méthode, le temps d'acquisition a été très long et le rapport signal/bruit élevé. Le DA observé est faible, ceci tend à confirmer qu'en présence d'impuretés protéiques, les RMN du solide ^{13}C et ^{15}N sont perturbées. En effet, les protéines modifieraient les intégrales des signaux (Kasaai, 2010).

La RMN ^1H est également appliquée à la chitine commerciale selon la technique décrite à la section III.1.1. Le spectre résultant de cette analyse est illustré par la figure II.20.

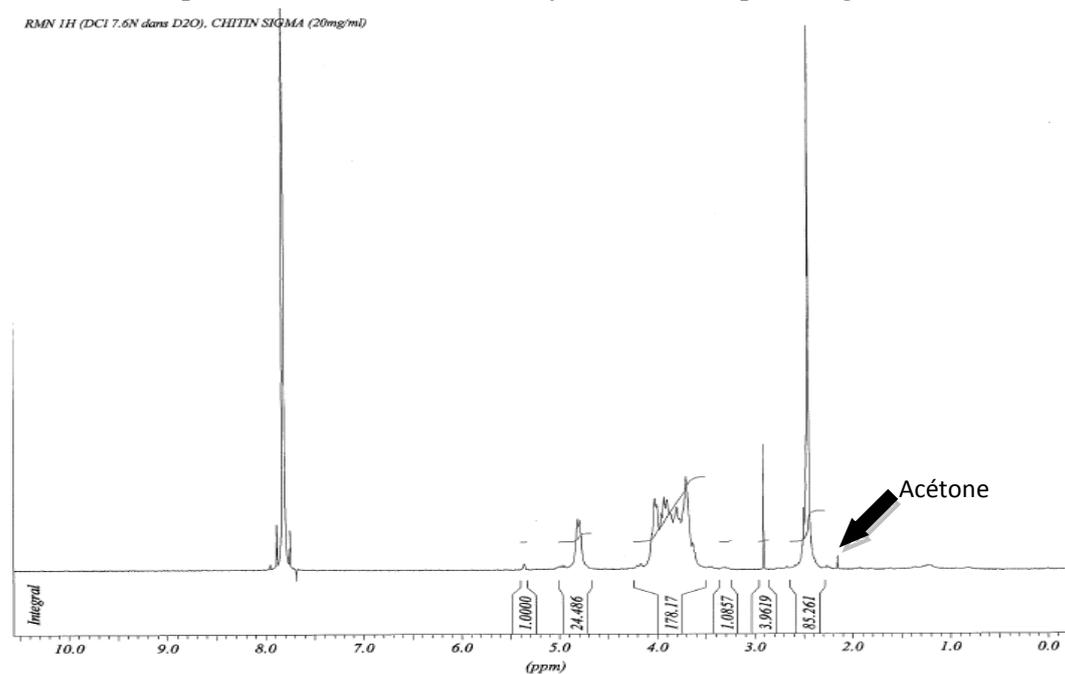


Fig.II.20 : Spectre RMN ^1H de la chitine commerciale

Le degré d'acétylation observé est de $95,5 \pm 1,0$ %, ce qui correspond à l'ensemble des données de la littérature. La mesure est valable uniquement lorsque la production d'acide acétique/acétone, issu de la désacétylation de la chitine, est négligeable. D'après la figure II.20, la flèche noire montre la faible proportion d'acétone.

(b) Spectroscopie FT-IR

La spectroscopie FT-IR est également utilisée pour déterminer le degré d'acétylation. Elle a donc été appliquée au produit de 6 h d'hydrolyse enzymatique par 25 % de pepsine, à 40 °C (Fig.II.21).

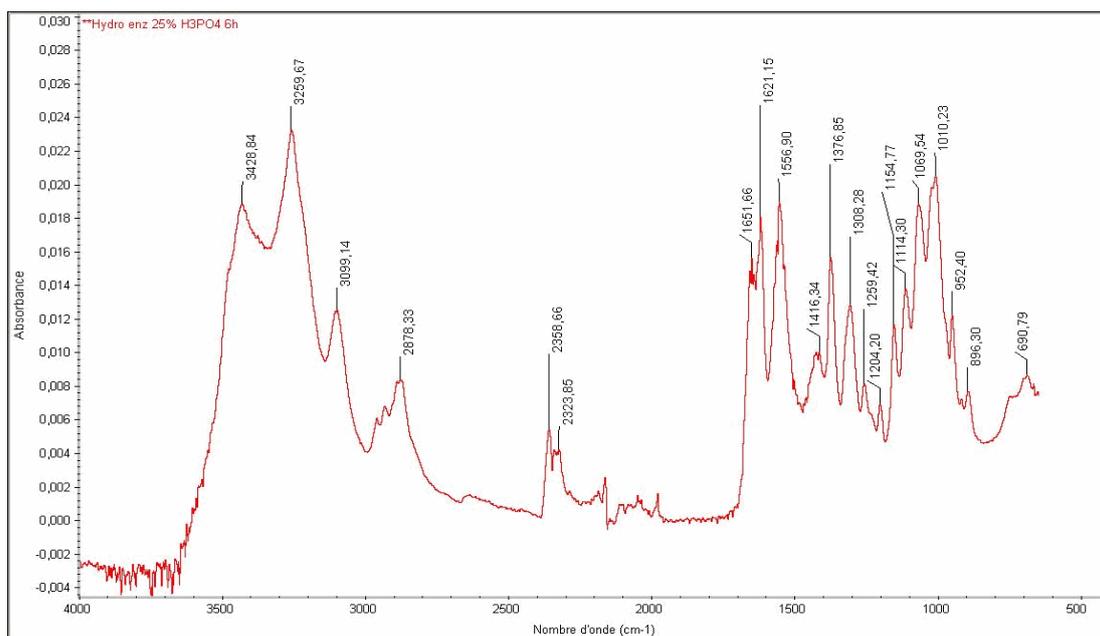


Fig.II.21 : Spectre FT-IR sur le résidu solide de 6 h l'hydrolyse par 25 % de pepsine à 40 °C, (analyse menée par le laboratoire BMM)

La littérature propose de nombreux rapports de signaux spécifiques à la chitine et au chitosan (Tab.II.3) pour déterminer le degré d'acétylation. Pour ce résidu insoluble d'hydrolyse enzymatique, le DA atteint près de 82,9 % avec les rapports des intensités I_{1652}/I_{1070} et I_{1652}/I_{3428} . Cette valeur est inférieure aux références de la littérature et au résultat obtenu par RMN ^1H .

IV.6. Estimation de l'indice de cristallinité

Comme l'explique la section III.3, suite à l'acquisition des données de diffractions aux rayons X, une déconvolution est pratiquée sur les spectres obtenus. Cette opération permet de distinguer les pics associés aux zones cristallines des zones amorphes. L'analyse est appliquée à la chitine commerciale (Fig.II.22).

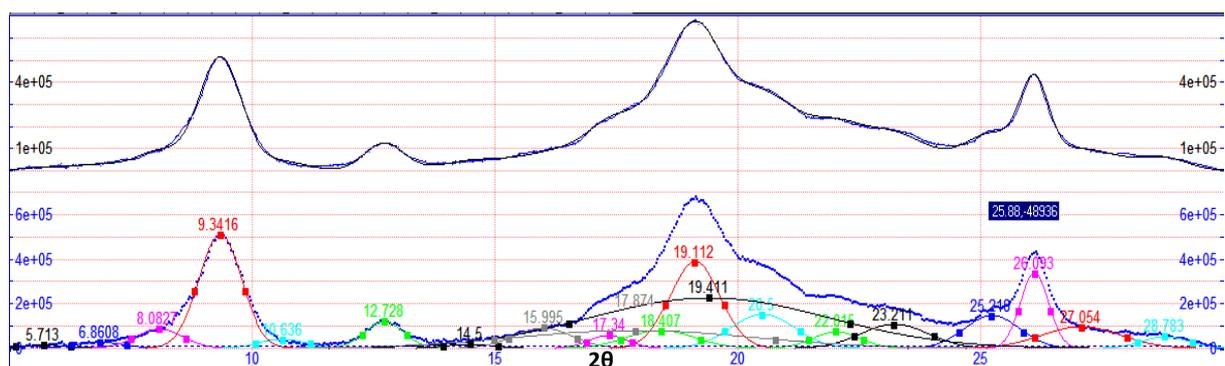


Fig.II.22 : Déconvolution du spectre de diffraction aux rayons X de la chitine commerciale Mahtani

La technique adoptée pour déterminer l'indice de cristallinité consiste à calculer le rapport entre l'aire des pics associés aux zones cristallines sur l'aire totale. L'indice de cristallinité atteint donc 53,9 % pour la chitine fournie par Mahtani.

V. Conclusion sur le choix des méthodes

La composition des produits est analysée par les méthodes classiques pour la teneur en eau, en lipides et en minéraux. La méthode sélectionnée pour les protéines est le dosage des acides aminés totaux par CPG. Bien que cette méthode sous-estime la quantité de protéines, elle demeure plus fiable et elle apporte des informations complémentaires sur la composition précise en acides aminés. Pour estimer la quantité de chitine, la méthode sélectionnée est la gravimétrie suite au traitement de l'échantillon au NaOH. Cette méthode est adaptée aux produits dont les protéines constituent l'essentiel des impuretés. Cependant, il est nécessaire de la valider par les bilans massiques et/ou l'analyse élémentaire.

Nous disposons également de l'ATG pour valider les résultats observés. Comme les autres méthodes, elle ne peut être employée seule pour estimer le degré de pureté en chitine d'un produit. Cependant, par comparaison entre produits, elle offre une indication sur leur degré de relatif.

La RMN du liquide ^1H est sélectionnée pour mesurer le degré d'acétylation. Nos produits étant composés essentiellement de chitine peu désacétylée, cette méthode convient. Elle est préférée à la spectroscopie FT-IR car cette dernière s'est montrée plus sensible à la présence des impuretés, notamment des protéines. La présence, ou l'absence, des pics caractéristiques de la chitine est utilisée uniquement en tant qu'indice qualitatif. Tandis que la RMN ^1H s'est révélée être davantage reproductible et fiable. Lavertu et al. (2003) rapportent également que la RMN ^1H l'emporte grâce à sa stabilité, sa spécificité et sa robustesse.

L'indice de cristallinité est mesuré via la diffraction par rayons X. La masse molaire, liée au degré de polymérisation, est estimée via la viscosité réduite par viscosimétrie à capillaire. Le tableau II.12 compare des caractéristiques physico-chimiques de chitines fournies par Mahtani et Sigma :

Fournisseurs	DA (%)	DP	C/N	I _{cr} (%)
Sigma	95,5 ± 1	/	7,0 ± 0,1	/
Mahtani	95,5 ± 1	5,7*10 ⁵ ± 0,5*10 ⁵	7,3 ± 0,1	53.9

Tab.II.12 : Comparaison des DA, DP, C/N et I_{cr} entre chitine commerciale

Le degré de polymérisation de la chitine fournie par Mahtani est plus faible que celui généralement exprimé dans la littérature (Pacheco, 2010 ; Ito et al 2000). Cependant, il faut souligner l'importance de l'incertitude de mesure, de l'ordre de 0,5*10⁵ g/mol. Le degré d'acétylation est conforme aux données que la littérature communique (Cf. Chapitre 1, V.2).

Visuellement, l'aspect général du produit constitue également un critère d'appréciation. Le produit obtenu par hydrolyse enzymatique est plus rosé que celui obtenu par voie chimique (Fig.II.23) :



Fig.II.23 : Comparaison visuelle entre le produit d'extraction chimique (a) et le produit d'hydrolyse enzymatique(b)

La différence de couleur est clairement visualisée sur la figure II.23 et laisse deviner la forte présence d'impuretés dans le produit d'hydrolyse enzymatique (5 % de pepsine, 6 h de protéolyse et 42 °C, à partir fragments > 2,5 mm). Nous avons observé que la couleur des produits de l'hydrolyse enzymatique s'estompait avec le temps, probablement du fait de la dégradation des caroténo-protéines. Au contraire, le produit d'extraction chimique présente un bel aspect blanc, de texture plastique, convenable pour sa commercialisation.

Chapitre 3 – L'hydrolyse enzymatique en une seule étape par protéolyse acide

I. Introduction

Comme cela a été décrit précédemment, le principe du procédé d'extraction de la chitine, développé dans cette étude, consiste à procéder à la déprotéinisation et la déminéralisation simultanément. Cette fusion est permise grâce à une protéase dont l'activité protéolytique est optimale à pH acide. Ainsi, l'acidité du milieu réactionnel favorise à la fois la déminéralisation et la déprotéinisation. Le chapitre 3 traite des résultats concernant l'effet du milieu acide seul, puis les cinétiques d'hydrolyse enzymatique appliquée aux coproduits de crevettes. Les facteurs qui influencent les cinétiques de déprotéinisation et de déminéralisation sont analysés. Cette étude conduit à une optimisation des conditions d'extraction, via un plan d'expérience, et à la modélisation des cinétiques.

II. Le milieu réactionnel acide

Le protocole mis en place est décrit au chapitre 2.II. L'acide et l'enzyme employés requièrent certaines conditions qui vont être détaillées maintenant.

II.1. Choix de l'acide : l'acide phosphorique

L'acide sélectionné répond à deux exigences :

- réagir comme tampon avec le CaCO_3 présent dans la matière première,
- permettre la valorisation des composés issus de la phase liquide, notamment en agro-alimentaire.

L'acide employé pour établir ce protocole est l'acide phosphorique, H_3PO_4 . Il forme avec le CaCO_3 , un tampon autour de pH 2, lorsque l'équilibre stœchiométrique est atteint. De plus, l'acide phosphorique est autorisé en agroalimentaire comme d'additif, désigné sous le code E338, d'après la nomenclature européenne. La législation qui concerne le H_3PO_4 , est relative à son utilisation comme additifs et auxiliaire technologique. Il figure dans la liste des substances autorisées dans les matériaux au contact des denrées alimentaires (Journal Officiel N°67 du 20/03/2007 texte N°13). Dans l'alimentation, il est limité à 700 mg/l dans les boissons non alcoolisées (JO du 02/10/97), à 1 g/l dans les boissons alcoolisées à l'exception de la bière et du vin, à 5 g/kg dans les céréales pour petit-déjeuner, à 5 g/kg dans les amuse-gueules, 1 g/kg dans le surimi, à 5 g/kg dans les pâtés de poissons et de crustacés, à 3 g/kg dans les nappages, à 4 g/kg dans les enrobages pour produits carnés et végétaux et à 5 g/kg dans les plats spéciaux (JO du 01/08/1998 ; Annexe A).

II.2. Effet de l'acide sur la déprotéinisation et de la déminéralisation

Avant d'étudier l'hydrolyse enzymatique, l'effet de l'acide ortho-phosphorique (H_3PO_4) seul est analysé. La température est fixée à 40 °C et le ratio d'acide par rapport à la matière première est de 5 :1 (v : w). Ainsi le pH est maintenu à 2 et les conditions sont similaires aux prochaines hydrolyses enzymatiques. La durée d'acidification varie de 7 à 360 min. Le poids final et les quantités résiduelles de minéraux et de protéines sont mesurés sur les produits

obtenus. Le premier point à 7 min marque le moment où l'enzyme sera introduite lors des prochaines hydrolyses enzymatiques (t_0).

La figure III.1 illustre les compositions des produits traités à l'acide phosphorique. Elle révèle que la quantité de minéraux diminue rapidement tandis que celle des protéines ne varie pas compte tenu de l'écart type des mesures.

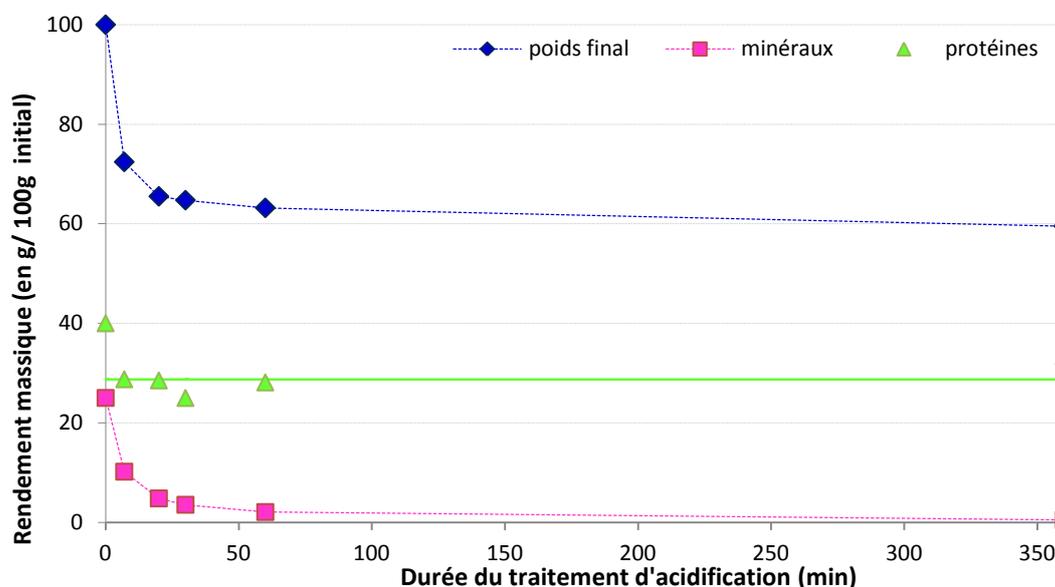


Fig.III.1 : Composition des produits traités par l'acide phosphorique en fonction du temps

Après 6 h d'acidification, la quantité résiduelle de minéraux s'approche de $0,5 \pm 0,4$ g/100 g. Celle des protéines résiduelles semble constante, autour de $28,7 \pm 3,3$ g/100 g pendant toute la durée du traitement. L'acidification de 6 h entraîne donc la perte de près de 98,1 % et 28,2 % respectivement.

Ceci signifie que l'acide phosphorique dissout convenablement le CaCO_3 , sans impact sur les liaisons peptidiques ni celles qui relient les protéines à la chitine. Moins de 2 % du CaCO_3 initialement présent demeure dans le produit traité 6 h à 40 °C, cette part est probablement piégée dans le réseau formé par les protéines et la chitine.

Les concentrations étant calculées pour être en conditions stœchiométriques, on peut émettre l'hypothèse que tout l'acide ortho-phosphorique est monopolisé pour réagir avec le carbonate de calcium. De plus, l'acidité du milieu implique que les protéines se comportent comme des donneurs de protons, au même titre que l'acide phosphorique. La réactivité entre protéines et H_3PO_4 est donc plus faible que celle qui s'opère entre H_3PO_4 le CaCO_3 dissout.

Rappelons que le temps initial de la réaction est compté à partir du moment où l'enzyme est introduite dans le milieu réactionnel, soit après environ 7 min d'acidification. De plus, l'effet de la taille initiale des fragments d'exosquelettes de crevettes sur l'extraction enzymatique est l'un des facteurs étudiés. La composition du substrat à t_0 est donc identifiée par catégorie de taille :

	< 1 mm	1 à 2,5 mm	> 2,5 mm
Poids (rendement massique)	64 %	71 %	78 %
Protéines	45 %	49 %	54 %
Protéines (g/100g)	29	35	38
Minéraux	10 %	14 %	18 %
Minéraux (g/100g)	6	10	14

Tab.III.1 : Composition du substrat à t_0 de l'hydrolyse enzymatique

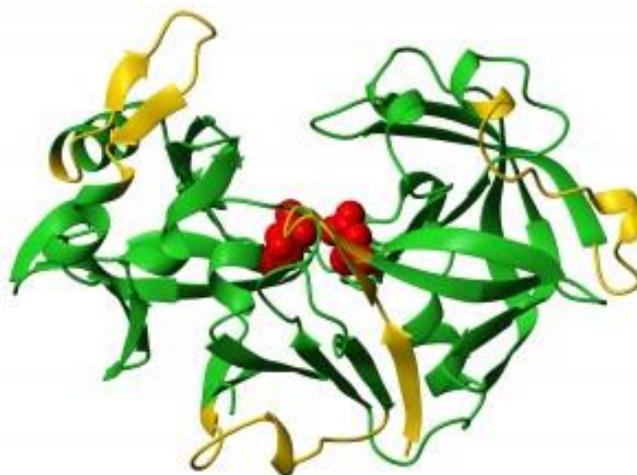
Le tableau III.1 nous indique la composition de la matière première en fonction de trois catégories de taille des fragments d'exosquelette de crevettes. Des différences de rendements massiques, protéines et minéraux résiduels sont observées. Cette caractérisation sera utilisée pour l'étude des cinétiques d'hydrolyse pour la suite de l'étude (à partir de la section IV).

III. La protéase acide

III.1. Choix de la protéase : la pepsine

La pepsine a été identifiée au 18^{ème} siècle, puis elle est étudiée et décrite par T. Schwann en 1825. L'origine de son nom se réfère à « *pepsis* », la digestion en grec ancien (Barret et al. 1998). On distingue les pepsines A, B et C. La pepsine A (ou I dans certaine littérature) est la principale enzyme de l'estomac humain, tandis que la pepsine C est une enzyme mineure de la digestion. La forme B est caractéristique du porc, c'est la forme généralement utilisée par les industries (EC 3.4.23.1) et celle que nous utilisons pour cette étude. Son poids moléculaire est de l'ordre de 34,5 KDa. Elle compte 326 acides aminés et sa structure cristalline (Cf. Chapitre 1.V.1) est caractérisée par un dimensionnement de **a** et **b** = 6,74 et **c** = 29,01 nm avec les angles α et β = 90 et γ = 120 (Cooper et al. 1990). La protéolyse mise en œuvre dans cette étude, est suivie d'une filtration à travers des toiles filtrantes, dont la porosité est de 45 μ m. La pepsine peut donc passer dans la phase soluble.

La pepsine est présente dans le système digestif de la plupart des vertébrés, en particulier dans le duodénum, où elle est employée à hydrolyser les protéines. Son précurseur est le pepsinogène, il est activé dès sa libération en milieu acide (Rao et al. 1998).

Fig.III.2 : Représentation schématique de la pepsine (Source Web, <http://dwb4.unl.edu>)

Cette endopeptidase appartient à la famille des aspartate-protéases, comme d'autres cathepsines¹⁷ et les rénines¹⁸. Sur la figure III.2, la zone rouge correspond au site actif constitué d'aspartates et les zones dorées sont quatre peptides utilisés comme anticorps.

La pepsine est également considérée comme une hydrolase car elle requiert une molécule d'eau. Son mode d'action est décrit par la figure III.3 :

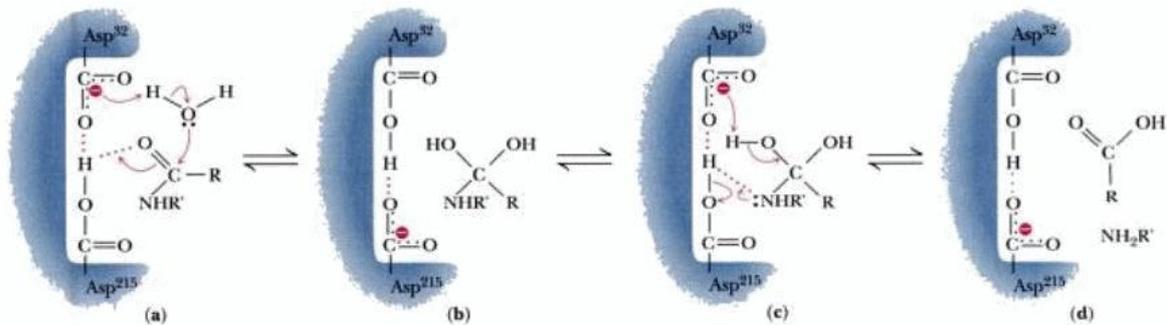


Fig.III.3 : Mécanisme proposé pour la protéolyse par les aspartate-protéases (Reginald et al. 1974)

La première étape (a) consiste en deux transferts de protons, ce qui facilite (b) l'attaque nucléophile du carbone du carbonyle de la liaison peptidique par l'eau. Puis (c) un résidu aspartate accepte un proton de l'un des deux groupes hydroxyle de l'amide déshydraté de la liaison peptidique. L'amine libre de la liaison est comblée par un proton donné par un autre résidu aspartate (d).

III.1.1. Activité protéolytique

La pepsine lyse préférentiellement les extrémités N-terminales des acides aminés polaires aromatiques, qui sont la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine.

Généralement les conditions de protéolyse par la pepsine se situent entre pH 1,8 et 4,4 et entre 37 °C et 50 °C (Fig.III.4) :

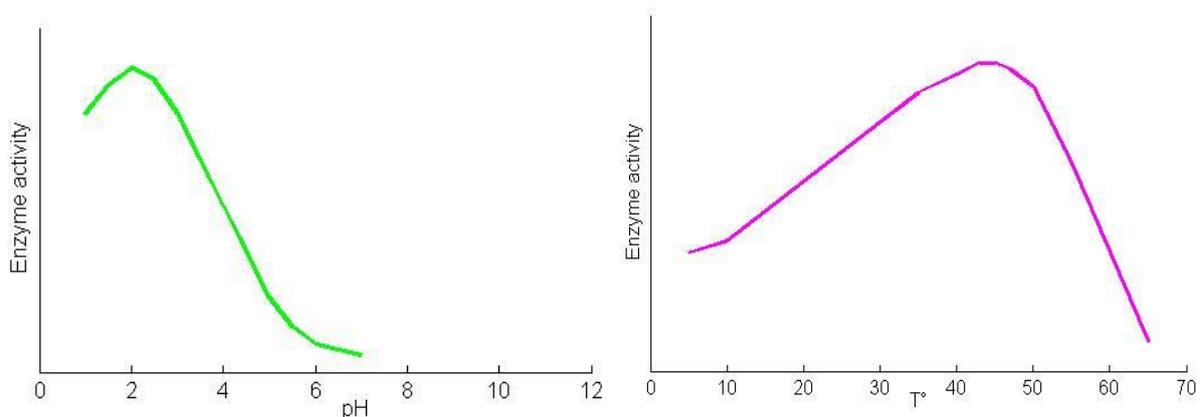


Fig.III.4 : Conditions de pH (A) et T°(B) optimales de protéolyse

¹⁷ Famille de protéases impliquées dans la dégradation de protéines par le lysosome

¹⁸ Enzyme du rein

Néanmoins cette gamme est à nuancer car les conditions optimales de protéolyse sont spécifiques à un couple enzyme-substrat donné. L'activité protéolytique est mesurée via l'absorbance à 280 nm de la phase soluble, cette mesure est liée à la quantité de tryptophanes libérés. L'unité d'activité protéolytique est fonction du temps et de la quantité de protéines présentes initialement (Fig.III.4).

La pepsine porcine est inactivée lorsque le pH dépasse 6. Les constantes k_{cat} (constante de catalyse dans la relation $V_{max} = k_{cat}[E]_t$) et k_M (constante de Michaëlis, équivalent la consommation en substrat lorsque $V_{max} = 1/2$) caractérisent les réactions enzymatiques (Fig.III.5). Le rapport optimal k_{cat}/k_M , utilisé comme indicateur, se situe autour de 3,5 (Lin et al. 1992), cependant il dépend également du couple enzyme-substrat. Pour l'hémoglobine, le pH optimal de la protéolyse est à 2.

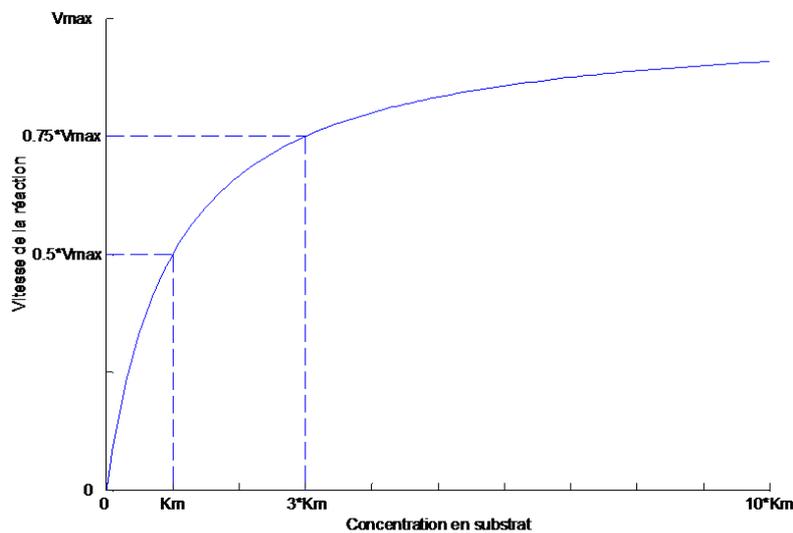


Fig.III.5 : Modèle selon Michaëlis-Menten, de la vitesse de réaction en fonction de la consommation en substrat

Outre la pepsine porcine, celles extraites d'estomac de poissons, principalement du thon, ont été étudiées. Par exemple (Nalinanon et al. 2010), cette pepsine a été utilisée pour purifier des composés protéiques de haute valeur ajoutée, telles que des molécules aromatiques. Ses conditions d'activité optimales sont proches de celles de la pepsine porcine, bien que de température légèrement plus faible. La cause provient du fait que les poissons sont adaptés pour des environnements plus froids. Le rapport k_{cat}/k_M de la pepsine de thon, de l'ordre de 0,6, est inférieur à celui de la pepsine porcine.

La pepsine est déjà employée industriellement en agroalimentaire. Elle est utilisée dans la fabrication de boissons et en fromagerie. Son activité protéolytique est également exploitée pour éliminer des impuretés protéiques. Furuhashi et al. (2009) l'emploient pour traiter au préalable des carapaces de mollusques, avant d'être analysées en spectroscopie IR et CP/MAS. Le cas échéant, ces impuretés protéiques interfèrent et biaisent l'analyse. La digestibilité de la pepsine vis-à-vis de l'azote a été estimée à 78,9 % par Rehbein et al. (1981) sur du krill.

III.1.2. Activité chitinolytique

Ilankovan et al. (2006) montrent que la pepsine possède également une activité chitinolytique élevée, c'est-à-dire la capacité à hydrolyser des liaisons glycosidiques. Cette activité conduit à la dépolymérisation du polysaccharide. Le substrat des expériences d'Ilankovan et al. (2006) est le chitosan. Il est consommé par la pepsine qui le convertit en oligomères de chitosan. Une incubation de 24 h à pH 5,4 et 44 °C aboutit à 71,5 % de chitobioses, 19 % de N-acétylglucosamines et 9,5 % de chitotrioses.

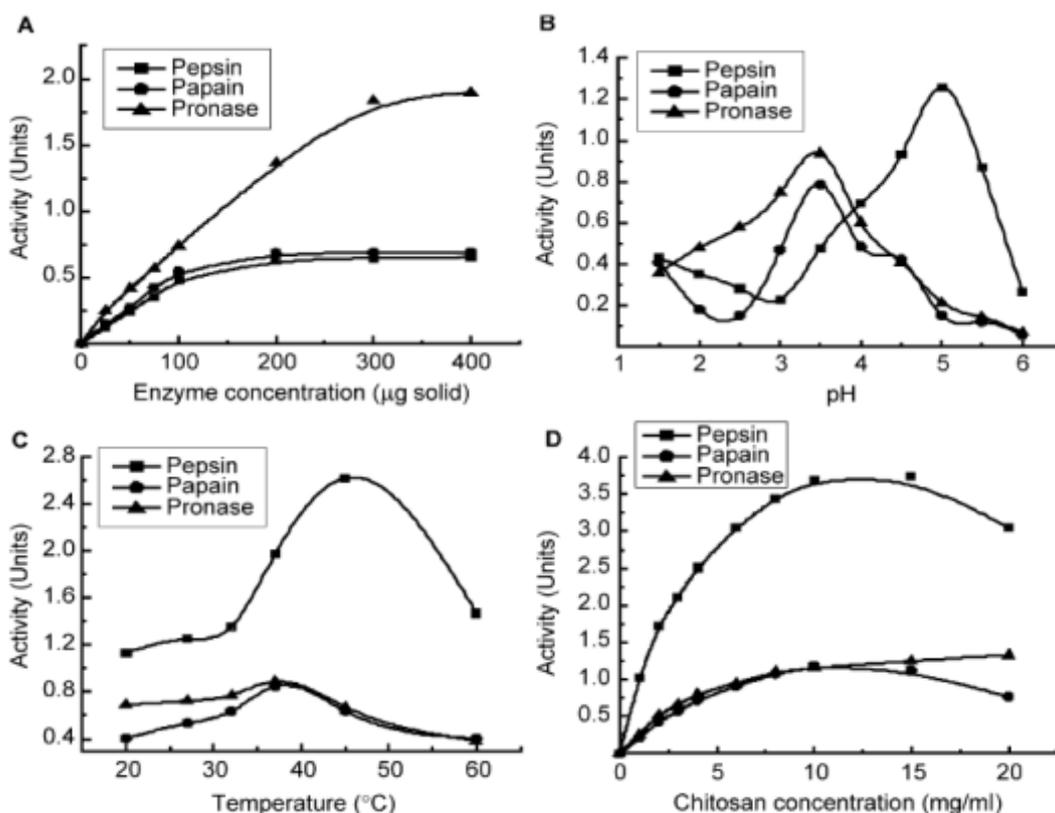


Fig.III.6 : Comparaison sur la chitosanolyse selon 3 protéases différentes, effet de la concentration en enzyme (A), du pH (B), de la température (C) et de la concentration en substrat (D), Kumar et Tharanathan 2004

L'activité chitinolytique est mesurée pour 1 % d'enzyme par rapport à la quantité de chitosan, lui-même dissous dans de l'acide acétique à 1 %. La réaction est stoppée par du NaOH 2N, jusqu'à neutralité, puis le mélange est centrifugé. Le culot est lavé et dialysé. Enfin les groupes à extrémités réductrices sont quantifiés pas HPLC. L'unité est exprimée en µmoles/min /mg de protéines initiales. La chitosanolyse optimale a été obtenue avec un pH de 5,0 et une température proche de 44 °C (Fig.III.6). Avec 4,98 unités, la pepsine de porc présente l'activité chitinolytique la plus élevée, par rapport à la papaïne et la pronase (protéase extraite de *Streptocymes griseus*). Cependant, elle reste inférieure à celle d'une chitosanase standard, dont l'activité se situe autour de 50,0 unités (Kumar et Tharanathan, 2004).

La chitine, protégée par son groupement acétyle, est supposée être moins sensible à l'hydrolyse des liaisons glycosidique par rapport au chitosan. Ce risque devra être vérifié par la suite.

III.2. Les conditions d'hydrolyse par la pepsine pour extraire la chitine

III.2.1. Les paramètres du procédé à étudier

L'accessibilité au site actif de l'enzyme dépend de l'affinité de l'enzyme avec le substrat et des conditions du milieu. En effet, l'enzyme reconnaît une structure spécifique mais cette structure est sensible à son environnement tel que le pH, la température et l'hydratation.

La pepsine est employée, dans cette étude, pour sa capacité à hydrolyser les liaisons peptidiques, et non les liaisons glycosidiques. Le pH optimal de la dépolymérisation se situe autour de 5 tandis que celui de la protéolyse se situe autour de 2 (Fig.III.4). Par conséquent, le pH du milieu réactionnel, fixé à 2, devrait favoriser la déprotéinisation et non la dépolymérisation.

La température optimale de la chitosanalyse est légèrement plus élevée (45 à 50 °C) que celle de la protéolyse (40 à 45 °C). Pour éviter le risque de dépolymérisation, il est plus sûr de maintenir une température plus faible. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur l'effet de la température vis-à-vis de la pepsine sur la carapace de *P. vannamei*. Une variation sensible de la température peut favoriser la protéolyse. Cet impact va être étudié dans le cadre d'un plan d'expérience.

Le rapport entre la concentration en enzyme et la concentration en substrat est également un paramètre déterminant vis-à-vis de l'activité enzymatique. Comme les précédents paramètres, le rapport optimal est spécifique à un couple enzyme/substrat. Pour le couple de cette étude, pepsine/exosquelette de crevettes, nous ne disposons pas de données. Ce paramètre va donc être étudié dans le cadre du plan d'expérience.

Enfin, l'accessibilité au site actif a été évoquée précédemment. Outre la stéréospécificité du substrat, elle est liée à la taille des fragments et plus particulièrement à la surface de contact disponible entre les fragments de substrat et les sites actifs enzymatiques. Cet aspect doit également être étudié pour le couple pepsine/ exosquelette de crevettes, il intègre donc le plan d'expérience.

III.2.2. Mise en place d'un plan d'expérience

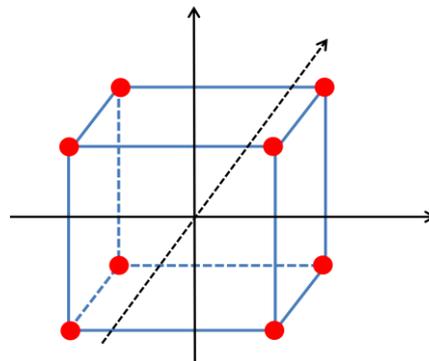


Fig.III.7 : Représentation schématique d'un plan factoriel complet d'expérience 2^k

Le plan d'expérience est un outil indiqué lorsque plusieurs facteurs sont susceptibles

d'influencer un procédé. Son intérêt est d'estimer leurs effets, leurs poids et leurs interactions, par un nombre minimal d'expériences. Il existe une vaste gamme de plans d'expériences disponibles, qui s'adaptent selon les phénomènes étudiés. Pour cette étude le choix s'est porté sur un modèle simple, un plan factoriel complet à deux niveaux, décrit par la formule 2^k . La première étape consiste à établir les bornes du domaine d'étude qui sont les valeurs minimales et maximales des facteurs à étudier. Les extrémités du plan sont notées (-1) et (+1). Les bornes du domaine peuvent être représentées par les points rouges de la figure III.7.

Les variables étudiées sont la température, la concentration en pepsine par rapport à la quantité de protéines dans la matière première et la taille des fragments d'exosquelette de crevette *P. vannamei*. L'effet de la durée d'hydrolyse enzymatique est également suivi. Les bornes du plan d'expérience sont décrites par le tableau III.2 :

Durée	Température			[pepsine]/[protéines]			Taille des fragments		
	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1
6 h	37 °C	40 °C	43 °C	5 %	10 %	15 %	<1 mm		>2,5 mm

Tab.III.2 : Conditions du plan d'expérience : bornes des paramètres étudiés

Ce plan d'expérience mise en œuvre est un plan factoriel complet à deux niveaux (2^3) dont chaque expérience correspond à 10 durées d'hydrolyse différentes et indépendantes. Les durées sont comprises entre 10 et 360 min. Le plan est complété par trois expériences aux conditions moyennes, dites des « points centraux » et notées (0, 0, 0). Ces trois expériences permettent d'estimer la variabilité associée aux expérimentations. Le nombre d'expériences du plan est défini par la formule $(2^3 + 3) * 10$, soit 110 expériences indépendantes.

Les bornes minimales et maximales du plan, notées (-1) et (+1) ont été établies grâce à des expériences préalables et à la littérature. La température minimale est fixée à $37 \pm 0,5$ °C et la température maximale à $43 \pm 0,5$ °C. Dans ce rapport, nous avons fait le choix d'exprimer la concentration en enzyme par rapport à la quantité de protéines dans la matière première. Ceci facilite la transposition du procédé à d'autre type de matière première. Pour les bornes (-1) et (+1) du plan d'expérience, la concentration est fixée à 5 % et 15 % respectivement. La matière première broyée et triée sur des tamis constitue trois catégories de taille de fragments, inférieure à 1 mm, supérieure à 2,5 mm et entre ces deux limites. Ces fractions constituent respectivement les bornes (-1) et (+1) et le point central (0). La répartition des expériences est décrite par le tableau III.3.

Les résultats des expériences, dites « réponses », servent ensuite à établir un modèle sur une base polynomiale d'ordre 1 (III.1) :

$$n = 1 : Y = \beta_0 t + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{III.1})$$

Une fois le modèle de prédiction établi, il est confronté aux mesures observées grâce à la méthode des moindres carrés.

Ce plan d'expérience est conçu pour étudier les caractéristiques de la cinétique de protéolyse

acide, en fonction des paramètres qui l'influencent. L'exploitation plus approfondie de ces cinétiques sera abordée à la section V.

	Facteurs		
	Température	[Pepsine]	Taille
I	+1	-1	+1
II	+1	+1	+1
III	-1	-1	-1
IV	-1	+1	-1
V	0	0	0
VI	+1	-1	-1
VII	+1	+1	-1
VIII	-1	-1	+1
IX	-1	+1	+1
X	0	0	0
XI	0	0	0

Tab.III.3 : Description des conditions du plan d'expérience

Les réponses du plan correspondent aux analyses de caractérisation décrites au Chapitre 2.II, appliquées aux produits issus de chaque expérience (Fig.III.8). Le poids final est mesuré et rapporté au poids initial de matière première. Il traduit donc le rendement massique de l'extraction. Les principales impuretés liées à la chitine sont les protéines et les minéraux. Leur quantité est mesurée via le dosage des acides aminés et par incinération respectivement. De plus, elle est rapportée à la quantité initialement présente dans la matière première, afin d'en déduire leur degré d'élimination (degré de déminéralisation et de déprotéinisation). La mesure des lipides résiduels a été négligée. Elle est rapidement confondue avec l'incertitude liée à la méthode. Enfin, le degré de pureté est estimé par deux méthodes, le nettoyage des produits par traitement au NaOH 1,25 N et par le bilan massique. Le rapport C/N est également analysé et observé. Il constitue un indicateur complémentaire pour confirmer les deux précédentes méthodes.

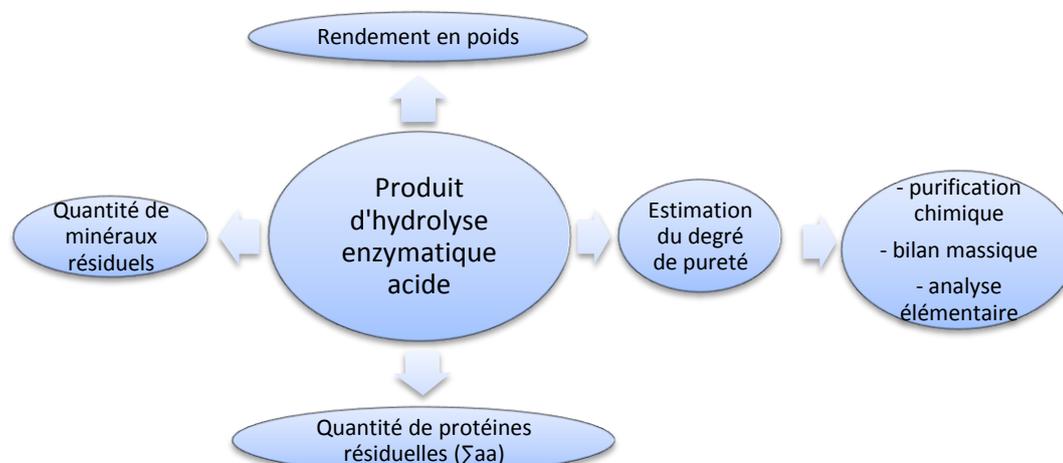


Fig.III.8 : Réponses du plan d'expérience : analyses de caractérisation des produits d'hydrolyse étudiées

IV. Optimisation de l'extraction de la chitine par hydrolyse enzymatique

IV.1. Résultats du plan d'expérience

Les résultats bruts du plan d'expérience sont d'abord présentés de la figure III.9 à III.15. Entre -7 min et t_0 , l'évolution des mesures est essentiellement due à l'acidification pendant la phase de stabilisation. À partir de t_0 , les mesures correspondent à la cinétique de l'hydrolyse enzymatique par la pepsine sur les exosquelettes de crevettes, selon les conditions du plan expérimental (Tab.III.4).

Les expériences aux conditions moyennes (points centraux, en vert) montrent une importante variation des résultats. Le rendement massique moyen est de $37,9 \pm 1,3$ g/100 g. Les degrés d'élimination des minéraux et des protéines moyens sont de $97,2 \pm 1,6$ % et $85,5 \pm 2,9$ % respectivement. Ceci traduit un manque de reproductibilité des expériences.

	+1	-1	0
Température	■	●	▲
[pepsine]	Sans contour	Contour	
Taille fragments	Bleu	Jaune	Vert

Tab.III.4 : Légende des résultats du plan d'expérience

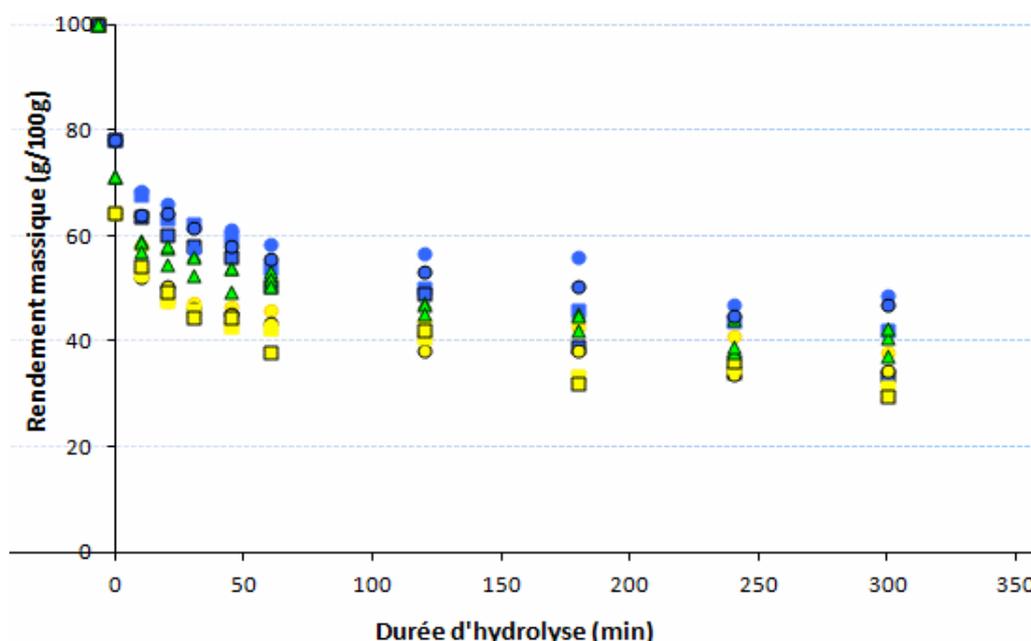


Fig.III.9 : Rendement massique en fonction de la durée d'hydrolyse – Plan d'expérience

Les rendements massiques, illustrés par la figure III.9, diminuent progressivement de 71,3 g/100 g à $37,9 \pm 1,3$ g/100 g pour les points centraux. Comme le tableau III.1 l'exprimait déjà, les expériences se distinguent nettement en fonction de la taille des fragments, dès t_0 . Pour les fragments supérieurs à 2,5 mm, la masse du résidu solide est de 78,1 g/100 g et de 64,4 g/100 g pour les fragments inférieurs à 1 mm. L'écart se réduit au fur et à mesure de l'hydrolyse. Après 6 h d'extraction, les moyennes des rendements massiques sont de $39,6 \pm$

4,4 et $34,5 \pm 2,6$ g/100 g pour les tailles (+1) et (-1) respectivement. Seul l'effet de la taille est clairement visible sur la figure III.9.

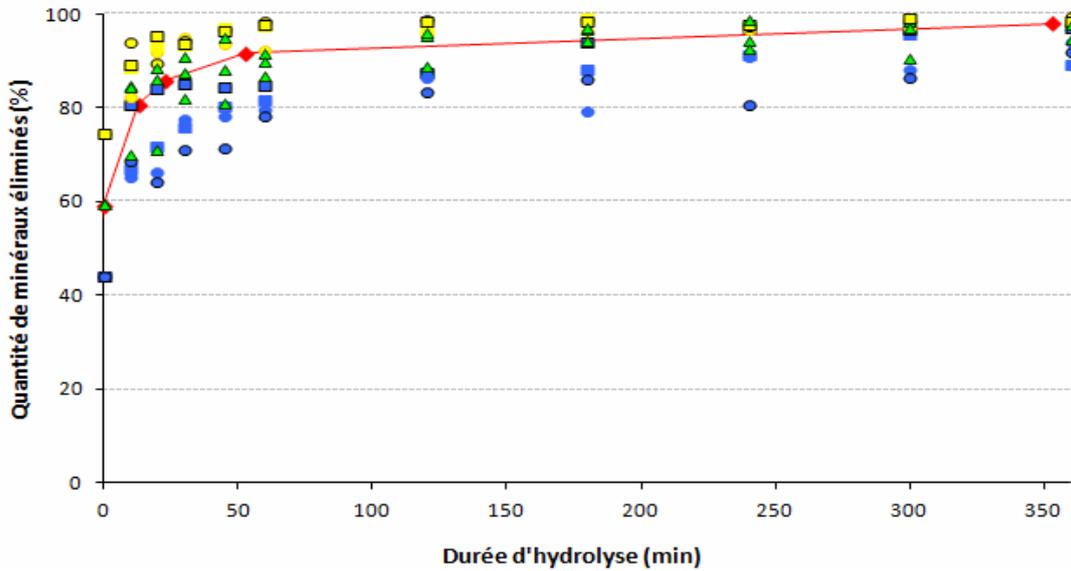


Fig.III.10 : *Quantité de minéraux éliminés en fonction de la durée d'hydrolyse – Plan d'expérience*

La figure III.10 exprime l'évolution du degré de déminéralisation. La légende est identique au précédent graphique. Elle est complétée par la courbe rouge qui illustre les pertes de minéraux à l'occasion de l'acidification seule (points reliés en rouge). Cette expérience a été menée pour des tailles de fragments intermédiaires. Dès t_0 , on observe que les points bleus sont situés sous la courbe tandis que les points jaunes sont au-dessus. On a donc un effet de la taille sur la déminéralisation. La différence de minéraux résiduels mesurés entre les deux catégories de tailles se réduit au fur-et-à-mesure de l'hydrolyse. L'élimination des minéraux après 6 h d'hydrolyse atteint en moyenne $98,8 \pm 0,4$ et $93,1 \pm 3,3$ % pour les tailles (-1) et (+1) respectivement.

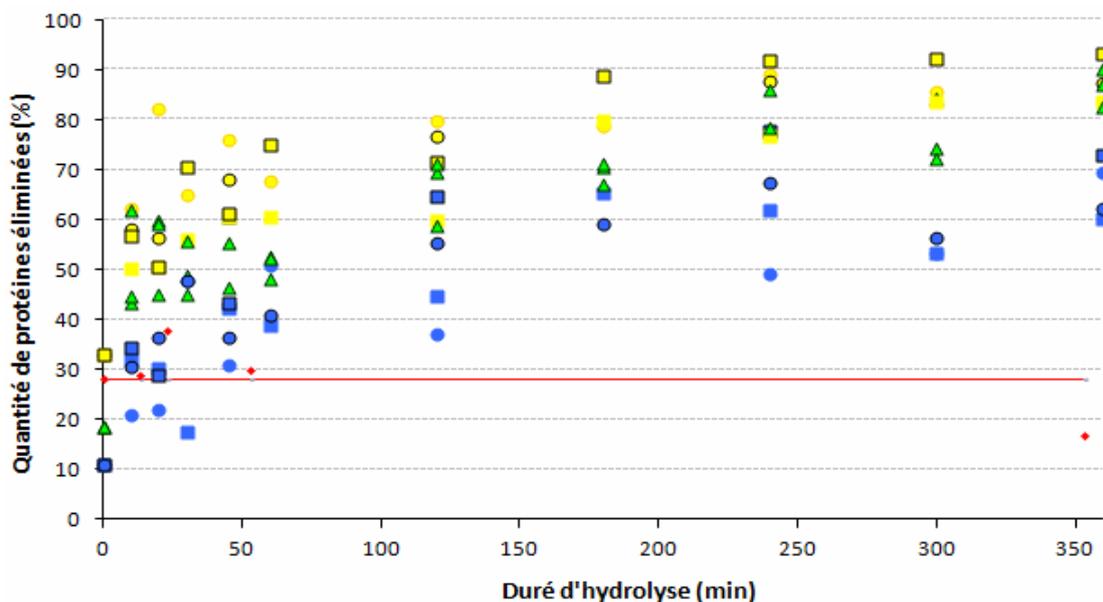


Fig.III.11 : *Quantité de protéines éliminées en fonction de la durée d'hydrolyse – Plan d'expérience*

Une démarche analogue est appliquée pour étudier la déprotéinisation (Figure III.11). La courbe rouge illustre la moyenne des pertes en protéines à l'occasion de l'acidification seule, pour des tailles intermédiaires. Aucune élimination significative de protéines n'a été constatée à partir de t_0 (Fig.III.1). L'introduction de la pepsine est donc nécessaire pour initier la déprotéinisation. La distinction entre les points bleus (grande taille) et jaunes (petite taille) est à nouveau très visible. En moyenne la déprotéinisation atteint $63,6 \pm 5,7 \%$ et $86,4 \pm 3,8 \%$ pour les tailles (+1) et (-1) respectivement, après 6 h d'hydrolyse. L'effet de la taille semble donc dominer le contrôle de la déprotéinisation.

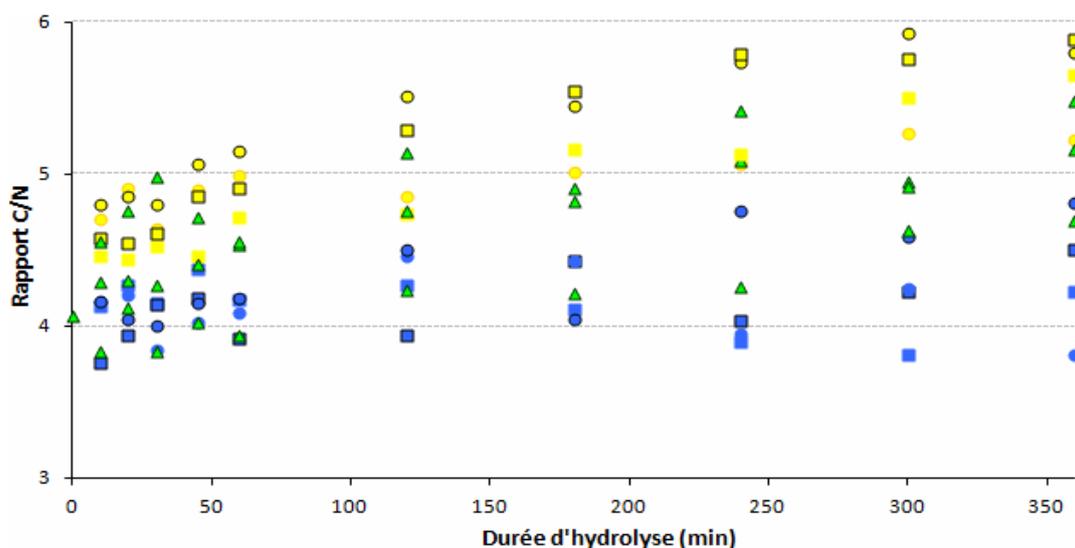


Fig.III.12 : Evolution du rapport C/N en fonction de la durée d'hydrolyse – plan d'expérience

Enfin, l'analyse élémentaire est exploitée. Elle fournit plusieurs informations, d'une part le pourcentage de carbone, celle de l'azote et donc le rapport entre les deux. Les teneurs en azote et les rapports de C/N permettent de dégager certaines tendances. La figure III.12 illustre l'évolution du rapport C/N. La moyenne observée pour les points centraux, à 6 h d'hydrolyse, est de $5,1 \pm 0,3$. Celui de la matière première est de $4,3 \pm 0,2$. Les rapports C/N des points bleus, évoquant la grande taille de fragments, ne semblent pas varier significativement. Leur moyenne se situe à $4,3 \pm 0,4$. Elle est proche de celle de la matière première. Tandis que les points jaunes, associés à la petite taille de fragments, présentent une augmentation relative du rapport C/N. Leur moyenne est de $5,63 \pm 0,26$ et il atteint jusqu'à 5,89 avec l'expérience VII.

La part de l'azote est un indicateur important. Le chapitre 2.V.4.1, évoque que la gamme théorique de teneurs en azote associés aux protéines couvre celle de la chitine. Sur la base de leur composition élémentaire, le pourcentage de N des acides aminés est compris entre 7,73 et 32,16 %. Il se situe entre 6,89 et 8,26 % pour les dérivés de la chitine. Ceci se traduit par un rapport C/N de 1,29 à 7,72 pour les protéines et de 5,33 à 6,86 pour le chitosan et la chitine respectivement. Le rapport C/N médian des protéines est de 4,5. Or les mesures effectuées sur la matière première se situent autour de $4,3 \pm 0,2$.

Le rapport C/N du produit solide de l'hydrolyse enzymatique doit donc théoriquement croître et tendre vers 6,86. Les rapports C/N des résidus solides du plan d'expérience augmentent progressivement jusqu'à un maximum de 5,89. Ceci montre une tendance vers la purification

de la chitine sans l'atteindre complètement.

Le raisonnement est identique pour la teneur en azote seule. Celle de la chitine est de 6,89 % et celle du chitosan est de 8,26 %. Les produits issus de ce procédé d'extraction doivent tendre vers 6,89 %. L'évolution de la teneur en azote (Fig.III.13) se distingue entre les gros fragments (en bleu) et les plus petits (en jaune). La teneur en azote des produits issus de l'hydrolyse à partir de substrats de petite taille, part de valeurs élevées, autour de 10,51 %, et tend vers des valeurs plus faibles et plus proche de celle de la chitine. La valeur minimale est obtenue par l'expérience VII (+1, +1, -1) avec 7,51 %. Toutefois, ce résultat n'indique pas le degré de pureté exacte de la chitine. Pour les produits issus d'hydrolyse à partir des fragments de plus grande taille, la teneur en azote semble restée globalement constante.

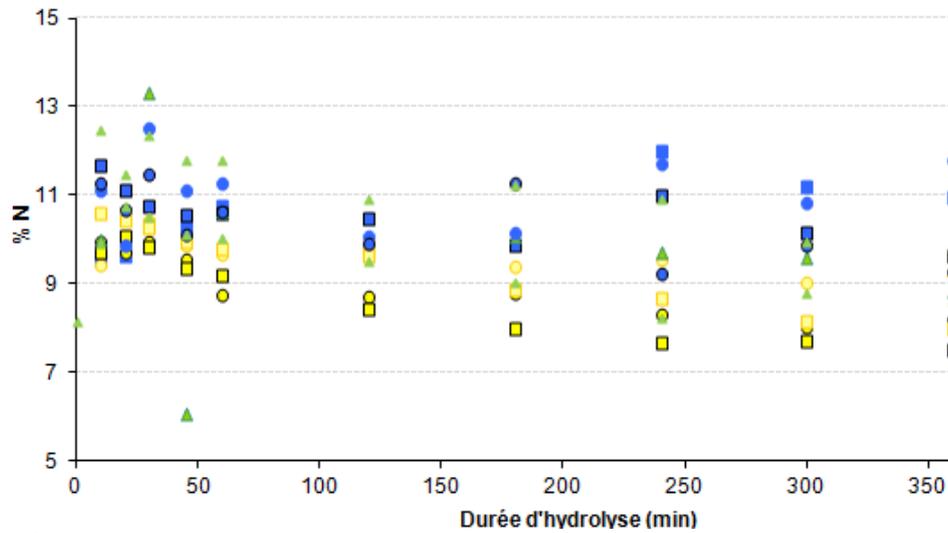


Fig.III.13 : Evolution du pourcentage d'azote en fonction de la durée d'hydrolyse – plan d'expérience

L'estimation du degré de pureté des produits, via le lavage chimique au NaOH, est présenté en figure III.14.

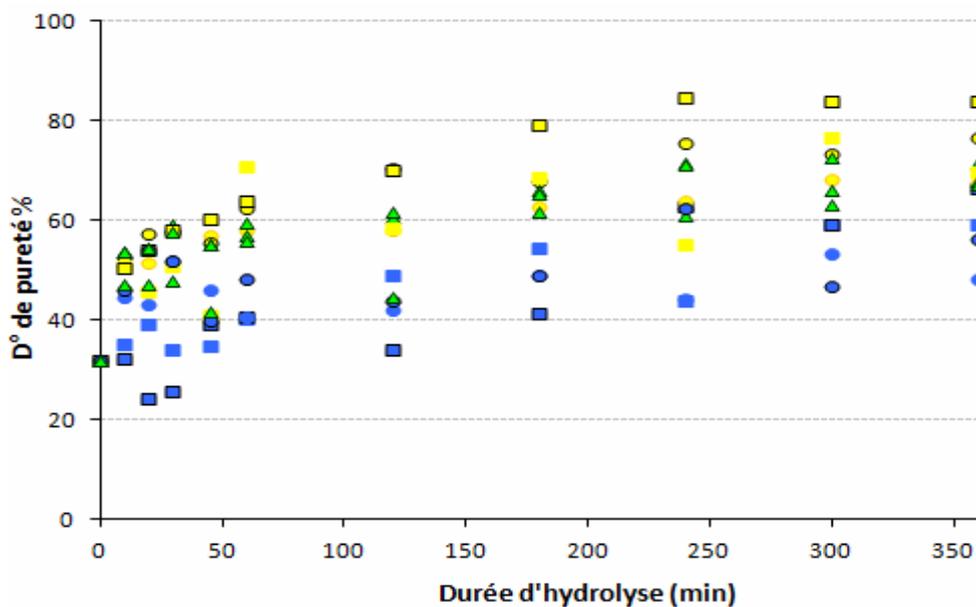


Fig.III.14 : Estimation du degré de pureté de chitine par lavage au NaOH – Plan d'expérience

La légende est identique aux précédents graphiques. Une nette distinction entre les points jaunes et les points bleus est à nouveau constatée. L'estimation du degré de pureté en chitine est faible lorsque la taille des fragments est grande, la moyenne à 6 h d'hydrolyse est de $57,6 \pm 6,5\%$. À l'inverse quand la taille des fragments est plus petite, l'estimation du degré de pureté est plus élevée, avec $74,5 \pm 6,3 \%$ de moyenne, après 6 h d'hydrolyse. L'écart type observé est important.

La quantité de chitine est également déterminée à partir du lavage chimique, elle est donc associée aux mêmes écart-types. La figure III.15 montre une variation de 20 à 30 g/100 g de chitine. Cette amplitude semble dissociée des conditions d'expériences. En effet, la moyenne des hydrolyses de 6 h, pour les plus petits et les plus grands fragments, atteint respectivement $25,4 \pm 1,8$ et $22,5 \pm 0,9$ g/100 g. L'écart est très peu significatif. Par ailleurs, les cinétiques présentent des estimations de quantités de chitine relativement constantes. Ceci semble indiquer que le procédé n'induit pas ou peu de pertes de chitine.

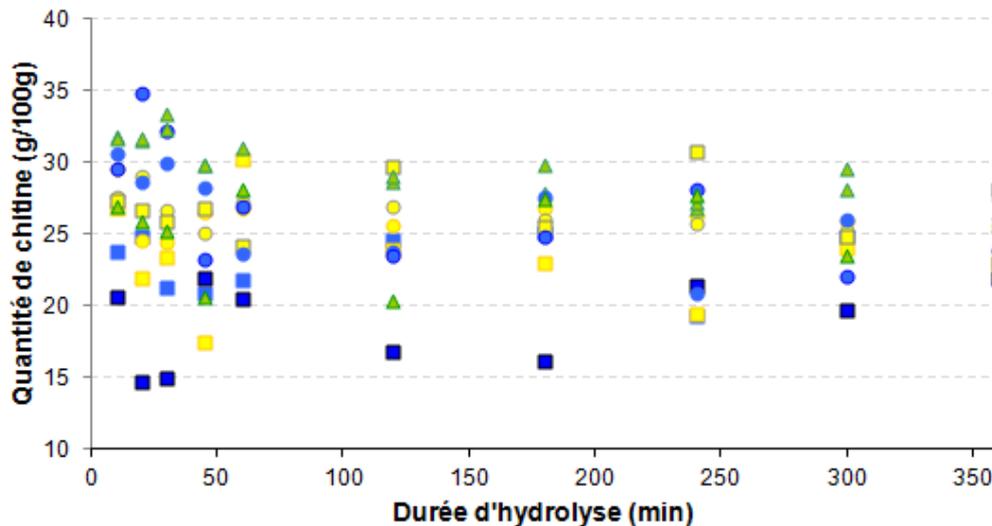


Fig.III.15 : Estimation de la quantité absolue de chitine par lavage au NaOH – Plan d'expérience

Pour conclure sur les résultats bruts de ces expériences, intéressons-nous aux caractéristiques des produits obtenus après 360 min d'hydrolyse enzymatique (Fig.III.16a et b).

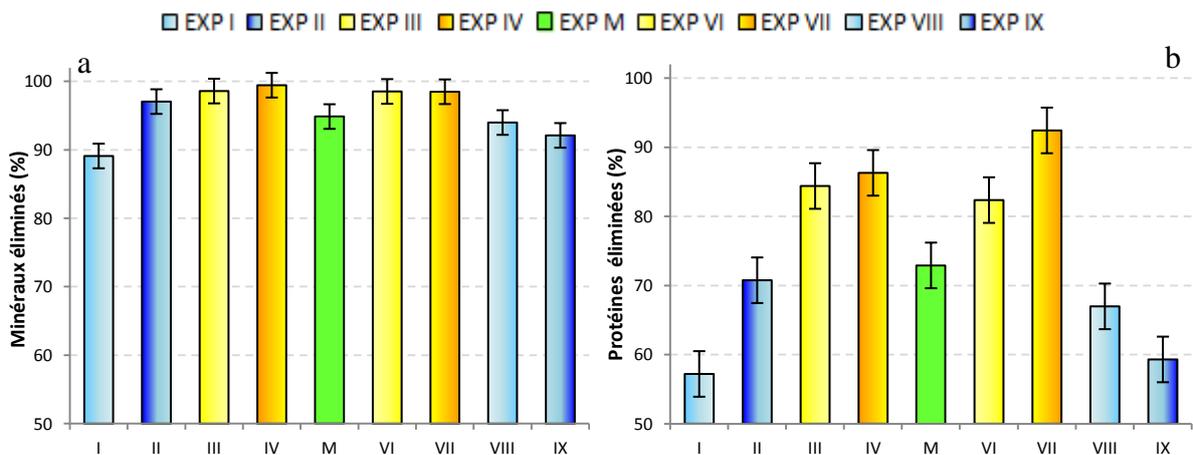


Fig.III.16 : Degrés d'élimination (%) des minéraux (a) et des protéines (b) en fonction de l'expérience

Sur la figure III.16, l'expérience M correspond à la moyenne des trois produits des cinétiques intermédiaires (0, 0, 0). L'écart-type associé à ces cinétiques est reporté à chaque expérience. Il est estimé à 1,8 et 3,3 % pour le degré de déminéralisation et de déprotéinisation. Les expériences illustrées en jaune, pour les petites tailles, se distinguent par leurs meilleurs degrés d'élimination. Parmi ces expériences, la IV (-1, +1, -1) et la VII (+1, +1, -1) présentent les meilleurs résultats, respectivement 99,5 et 98,5 % pour la déminéralisation, 86,3 et 92,4 % pour la déprotéinisation. Elles ont en commun l'emploi d'une forte concentration en pepsine, appliquée aux petites tailles des fragments.

Le degré de déminéralisation est satisfaisant comparé au rendement obtenus par d'autres procédés extraction biologique (Cf. chapitre 4, section I ; Xu et al. 2008) et au regard des objectifs qualitatifs industriels. À l'inverse, la teneur en protéines résiduelles est encore élevée, bien que ces degrés de déprotéinisation se situent dans la même gamme des résultats des études similaires (Cf. chapitre 4, section I ; Xu et al. 2008).

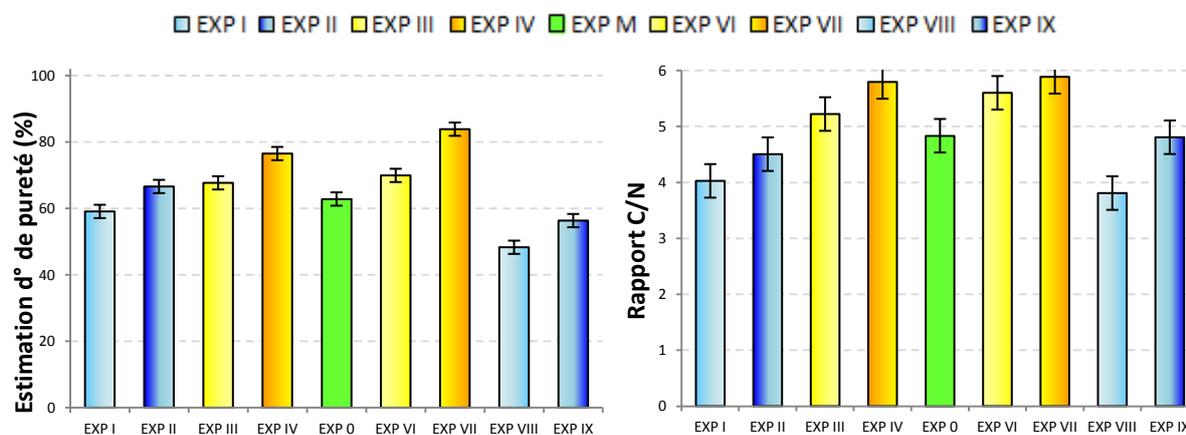


Fig.III.1 : Estimation du degré de pureté (a) et rapport C/N (b) en fonction de l'expérience

La figure III.17 montre l'estimation du degré de pureté par le lavage au NaOH (a) et le rapport C/N (b) des produits après 6 h d'hydrolyse par la pepsine. La légende est identique à la précédente figure. Les expériences IV et VII présentent des estimations de degré de pureté et de rapport C/N plus élevés. Ces expériences ont également en commun la concentration en pepsine la plus élevée, appliquée aux plus petits fragments. En plus de l'effet taille, déjà signalé, la concentration en pepsine semble donc améliorer les performances de l'hydrolyse enzymatique.

IV.2. Résultats de l'analyse statistique

Le traitement des résultats du modèle III.1 par STATGRAPHIC® est basé sur une analyse de la variance, selon une régression par un modèle linéaire généralisé. Un tableau d'analyse des variances est établi et permet d'estimer la significativité des variables. Le niveau de confiance est fixé à 5 %. Les coefficients discutés sont les valeurs p (ou *p-value*) et les ratios F (ou *ratio F*). Le premier permet de valider l'hypothèse selon laquelle le facteur à un effet (si la *p-value* ne dépasse pas 0,05) et le second, compare la robustesse du modèle. Les conclusions de ces analyses sont valables uniquement pour le domaine d'étude décrit par le tableau III.2.

Le traitement statistique est appliqué aux résultats du plan d'expérience (de t_0 à t_{360}), ce qui représente 120 résultats pour chaque réponse étudiée. L'intérêt est particulièrement porté sur la déminéralisation et la déprotéinisation.

IV.2.1. Degré de déminéralisation

Le modèle retenu pour le degré de déminéralisation, est déduit par l'équation III.2 :

$$D^{\circ} \text{ déminéralisation (\%)} = 53,4 + 0,2 * Tps + 0,6 * T^{\circ} - 10,4 * Taille + 2,5 * 10^{-2} * Tps * Taille - 3,8 * 10^{-4} * Tps^2 \quad (III.2)$$

L'équation III.2 exprime que l'augmentation de la durée d'hydrolyse et de la température pepsine favorise la perte en minéraux. À l'inverse, la taille des fragments doit diminuer pour aider la déminéralisation. Le R^2 est de 70,5 % et le R^2 ajusté est de 69,2 %. Les caractéristiques des coefficients statistiques sont détaillées dans le tableau III.5 :

Facteurs	Coefficients	Ratio-F	p-value
Durée	0,2	121,01	0,0000
Température	0,6	5,10	0,0258
Taille	10,4	92,59	0,0000
Durée*Taille	$2,5 * 10^{-2}$	15,45	0,0001
Durée ²	$3,8 * 10^{-4}$	40,64	0,0000

Tab.III.5 : Statistiques appliquées au degré de déminéralisation

L'analyse des *p-values* valide l'effet de la durée d'hydrolyse, de la taille des fragments et, dans une moindre mesure, celle de la température dont la *p-value* est plus élevée. De plus, il existe un effet de l'interaction entre la durée d'hydrolyse et la taille des fragments, ainsi qu'un effet quadratique de la durée d'hydrolyse. Le coefficient le plus important est celui associé à la taille des fragments de substrat, démontrant le poids de ce facteur. À l'inverse, l'effet de la concentration en pepsine n'a pas d'effet significatif sur la déminéralisation.

La figure III.18 représente le degré de déminéralisation estimé par l'équation III.2 en fonction de la taille de fragments et de la durée d'hydrolyse :

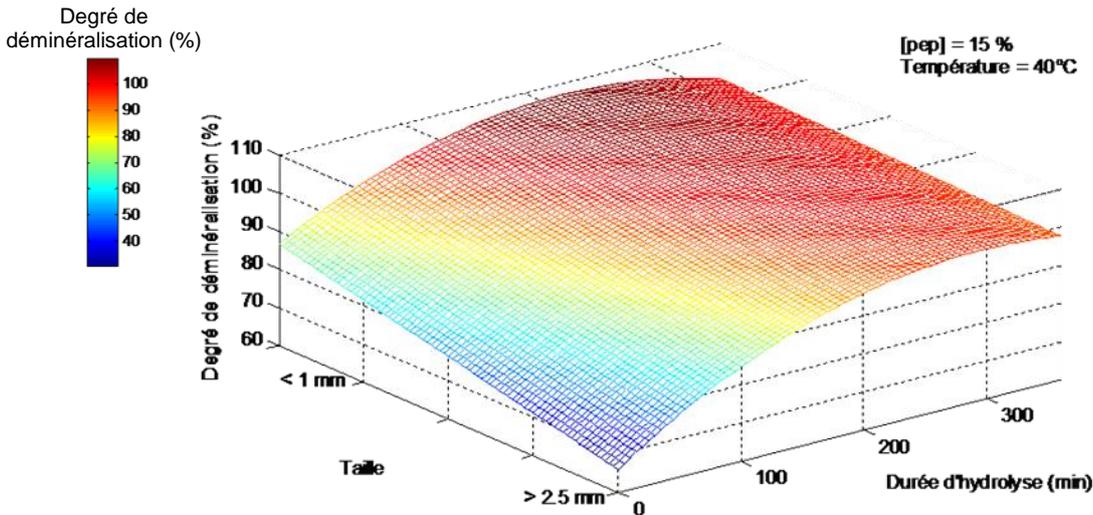


Fig.III.18 : Représentation du degré de déminéralisation en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine, à 40°C, selon l'équation III.2

La légende de la figure III.18 indique que les meilleures performances de déminéralisation tendent vers le rouge sombre, c'est-à-dire lorsque la taille des fragments de matière première est inférieure à 1 mm et que la durée d'hydrolyse augmente. Ces prédictions sont confirmées par les résultats observés et décrits à la section précédente. Cependant, le modèle prédit des performances au-delà de 100 %. On peut supposer que le modèle ne décrit pas parfaitement le phénomène. En effet, la structure polynomiale ne tend pas vers une stabilisation de la perte en minéraux en fin d'hydrolyse enzymatique. Une modélisation plus fine devrait permettre de décrire plus précisément la déminéralisation à la section V.

IV.2.2. Le degré de déprotéinisation

La même démarche est appliquée à l'élimination des protéines. Le degré de déprotéinisation est décrit par la relation III.3 et les indicateurs statistiques sont présentés par le tableau III.6 :

$$D^{\circ} \text{ déprotéinisation (\%)} = 43,1 + 0,2 * Tps - + 0,5 * [pep] - 12,2 * Taille - 4,1 * 10^{-4} * Tps^2 \quad (III.3)$$

Facteurs	Coefficients	Ratio-F	p-value
Durée	0,2	91,64	0,0000
[pepsine]	0,5	5,85	0,0173
Taille	12,1	158,15	0,0000
Durée ²	4,1*10 ⁻⁴	29,33	0,0000

Tab.III.6 : Statistiques appliquées au degré de déprotéinisation

Le tableau III.6 montre un incontestable effet de la taille des fragments. De même, la durée de l'hydrolyse a un impact et montre un effet quadratique sur la déprotéinisation. La température n'a pas d'effet significatif, sa p-value dépasse 0,05. La concentration en pepsine présente un effet moins significatif que celui des autres facteurs. L'équation III.3, prédit de meilleures performances de déprotéinisation lorsque la durée d'hydrolyse et la concentration en pepsine augmentent d'une part, et la taille des fragments de substrat décroît d'autre part. L'effet quadratique de la durée d'hydrolyse est également présent. Le R² associé à l'équation est de 82,1 % et le R² ajusté de 81,5 %. La figure III.19 du modèle estimé par l'équation III.3, en

fonction de la durée d'hydrolyse et de la taille des fragments, pour 15 % de pepsine et 40 °C.

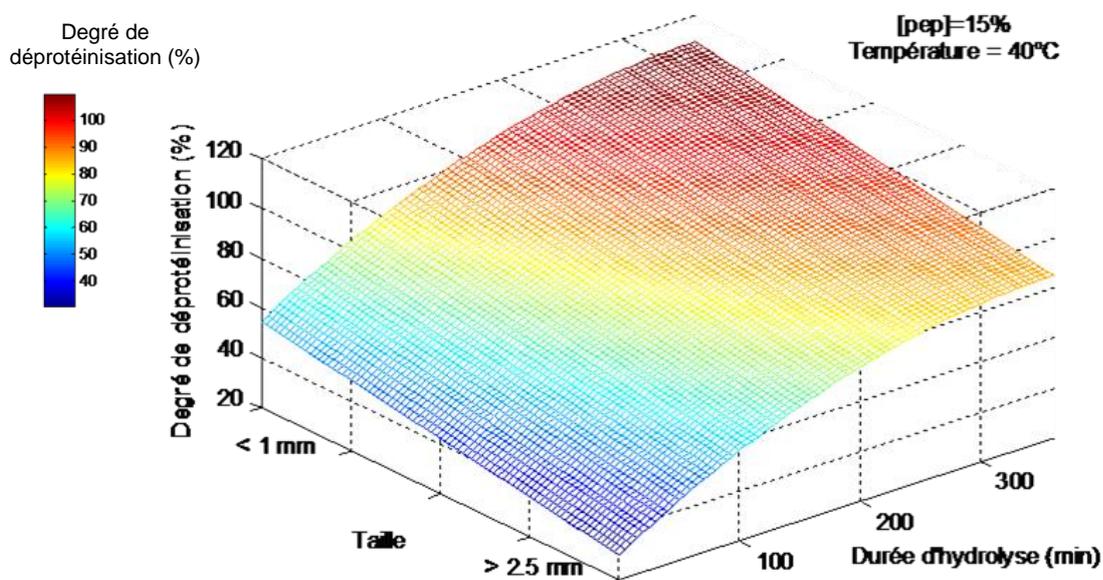


Fig.III.19 : Représentation du degré de déprotéinisation en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine et 40°C

La légende de la figure III.19 est identique à la précédente. Les meilleures performances de déprotéinisation sont atteintes, en rouge sombre, lorsque la taille des fragments de matière première est inférieure à 1 mm et que la durée d'hydrolyse augmente.

IV.2.3. Estimation du degré de pureté

L'évolution du rapport C/N en fonction de l'évolution des facteurs est décrite par la relation III.4 et les coefficients statistiques associés à ce modèle sont détaillés dans le tableau III.7:

$$C/N = 4,1 + 2,0 \cdot 10^{-3} \cdot Tps + 1,9 \cdot 10^{-2} \cdot [pep] - 0,4 \cdot Taille \quad (III.4)$$

Facteurs	Coefficients	Ratio-F	p-value
Durée	$2,0 \cdot 10^{-3}$	85,05	0,0002
[pepsine]	$1,9 \cdot 10^{-2}$	9,28	0,0029
Taille	0,4	182,90	0,0000

Tab.III.7 : Statistiques appliquées au rapport C/N

Contrairement aux précédentes réponses, l'effet quadratique n'opère pas significativement sur le rapport C/N. L'effet de la durée d'hydrolyse est confirmé, bien qu'il soit moins marqué que précédemment. La température est sans impact (sa p-value dépasse largement 0,05), tandis que la concentration en pepsine a un effet limité. Le facteur qui se distingue est à nouveau la taille des fragments de matière première. D'après l'équation III.4, le rapport C/N augmente lorsque la concentration en pepsine et la durée de l'hydrolyse augmentent, et que la taille des fragments de substrat est réduite au-delà de 1 mm. Le R² et le R² ajusté du modèle atteignent respectivement 70,3 % et 69,56 %. La réponse du modèle, illustrée par la figure III.20, se distingue des précédentes du fait de sa surface plane, associée à l'absence d'effet quadratique et d'interactions.

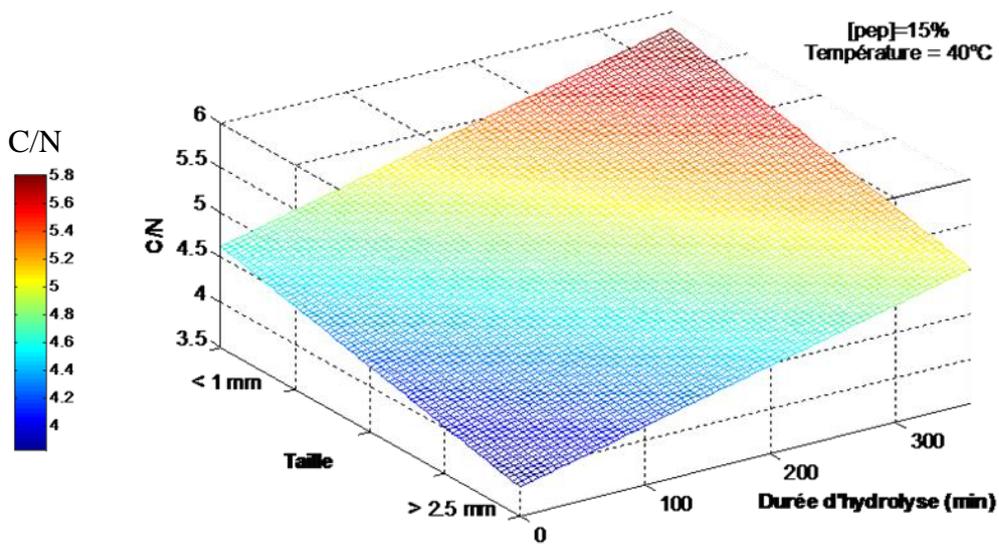


Fig.III.20 : Représentation du rapport C/N en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine et 40°C

Quant à l'estimation de la quantité de la chitine, après traitement chimique par NaOH, elle semble correctement décrite par la relation III.5 :

$$\text{Estimation chitine (\%)} = 37,5 + 0,2 \cdot Tps + 0,4 \cdot [\text{pep}] - 7,7 \cdot \text{Taille} - 2,5 \cdot 10^{-4} \cdot Tps^2 \quad (\text{III.5})$$

Le R^2 de l'équation III.5 est de 68,1 % et le R^2 ajusté est de 67,0 %. Comme pour le rapport C/N, la température n'a pas d'impact sur l'hydrolyse (la p -value est supérieure à 0,5) et celui de la concentration en pepsine est faible (p -value de 0,235), comme le montre le tableau III.8. Contrairement au rapport C/N, l'effet quadratique de la durée d'hydrolyse est significatif.

Facteurs	Coefficients	Ratio-F	p -value
Durée	0,2	44,21	0,0000
[pepsine]	0,4	5,27	0,0235
Taille	7,7	81,39	0,0000
Durée ²	$2,5 \cdot 10^{-3}$	13,35	0,004

Tab.III.8 : Statistiques appliquées au rendement massique après traitement chimique au NaOH

L'augmentation de la masse résiduelle après traitement chimique au NaOH est favorisée par l'augmentation de la durée d'hydrolyse, de la concentration en pepsine et par la réduction de taille des fragments de substrat.

IV.2.4. Récapitulatif des analyses statistiques

Le rendement massique est une combinaison des précédentes réponses, tous les facteurs interviennent (III.8). Cependant, l'impact de la concentration en pepsine est moindre par rapport aux autres facteurs, sa p -value est de 0,0092 et son ratio-F est de 7,02. L'effet de l'interaction entre la durée de l'hydrolyse enzymatique et la taille des fragments est également limitée, la p -value et le ratio-F sont de 0,005 et 8,19 respectivement. Le tableau III.9 détaille les résultats du traitement statistique associé au modèle de prédiction III.6

$$\text{Rdt massique} = 87,8 - 0,2 \cdot \text{Tps} - 0,6 \cdot T^\circ - 0,2 \cdot [\text{pep}] + 6,9 \cdot \text{Taille} - 1,1 \cdot 10^{-2} \cdot \text{Tps} \cdot \text{Taille} + 2,9 \cdot 10^{-4} \cdot \text{Tps}^2 \quad (\text{III.6})$$

Facteurs	Coefficients	Ratio-F	p-value
Durée	0,2	181,94	0,0000
Température	0,6	14,73	0,0002
[pepsine]	0,2	7,02	0,0092
Taille	6,9	109,79	0,0000
Durée*Taille	$1,1 \cdot 10^{-2}$	8,19	0,0050
Durée ²	$2,9 \cdot 10^{-4}$	67,15	0,0000

Tab.III.9 : Statistiques appliquées au rendement massique après traitement chimique au NaOH

L'objectif pour le rendement massique est d'atteindre la masse correspondante à la chitine seule, soit une masse inférieure à 30 g/100 g. D'après la figure III.21, l'objectif est obtenu lorsque la durée d'hydrolyse est augmentée et la taille des fragments réduite à 1 mm. Aucune déduction sur la qualité de la chitine ne peut être avancée d'après cette seule réponse.

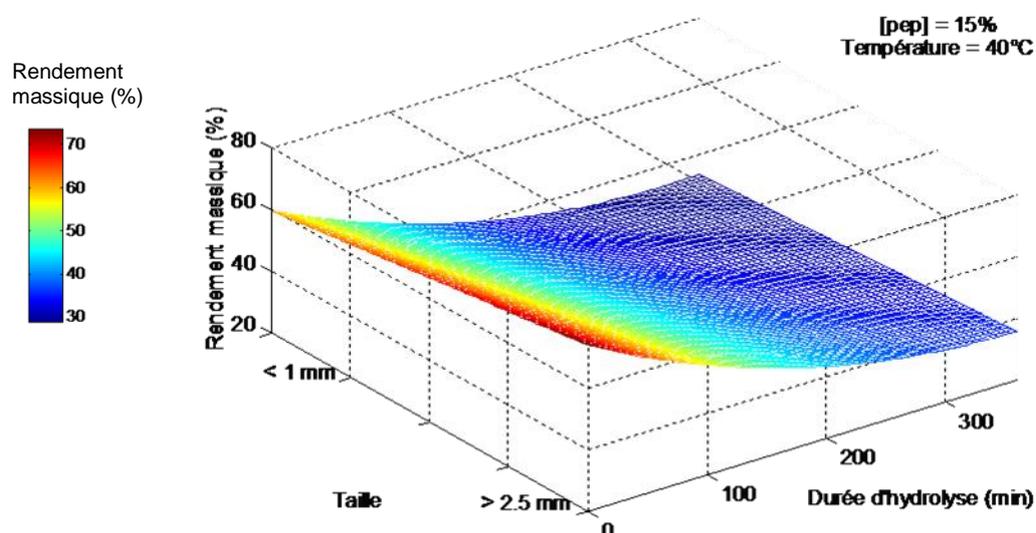


Fig.III.21 : Représentation du rendement massique en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments de substrat, à 15 % de pepsine et 40°C

Afin de vérifier la cohérence entre les réponses, le tableau III.10 résume et compare quels facteurs ont un effet sur chacune des réponses, et indique si cet effet est positif ou négatif.

Réponses	Durée	Température	Concentration en pepsine	Taille fragments
D° de déminéralisation	+	+	∅	-
D° de déprotéinisation	+	∅	+	-
Rapport C/N	+	∅	+	∅
Nettoyage chimique	+	∅	+	-
Rendement massique	-	-	-	+

Tab.III.10 : Comparaison des effets sur les différents aspects de l'hydrolyse par la pepsine

L'effet de l'interaction entre la durée de l'hydrolyse enzymatique et de la taille des fragments n'est pas représenté. L'augmentation de la température favoriserait la déminéralisation.

L'augmentation de la concentration en pepsine semble favorable à la déprotéinisation et à la purification de la chitine, d'après le lavage au NaOH et le rapport C/N. L'augmentation de la température et de la concentration en pepsine améliore le rendement massique. La taille des fragments d'exosquelette de crevettes est sans conteste l'élément dont l'effet est le plus marqué. La borne minimale du plan d'expérience englobe l'ensemble des morceaux inférieurs à 1 mm. Or d'après l'étude de Marquis-Duval (2008) au-delà de cette borne, la taille n'influence plus la cinétique de déminéralisation. Généralement, les écart-types associés aux résultats des cinétiques étaient supérieurs pour les tailles de fragments supérieures à 2,5 mm. Ceci est la conséquence d'une plus forte hétérogénéité du substrat dans cette catégorie de taille. En effet, le tri des fragments a certainement retenu tous les résidus de taille variée au-delà de 2,5 mm, comparés à ceux dont la forme devait traverser les tamis (Cf. Fig.II.7).

Enfin, les conclusions sur les effets des facteurs sur le rapport C/N paraissent incohérentes. D'une part le modèle ne présente pas de convergence asymptotique, d'autre part, l'effet de la taille n'est pas significatif. Il semble que le domaine d'étude soit trop restreint par rapport à l'échelle des valeurs de C/N obtenues.

Parmi les facteurs, la température, le ratio enzyme/substrat, le pH, le mode de préparation du substrat et le mode d'agitation du milieu réactif sont connus pour influencer les réactions enzymatiques. Les trois derniers paramètres cités ont été figés pour ces expériences et n'affectent pas le plan d'expérience. La taille initiale des fragments est indéniablement le facteur le plus important, quelque soit la réponse analysée. Cependant, l'aspect de la surface des fragments n'est pas connu et pourrait être étudié davantage pour déterminer si l'accessibilité est complète ou non.

Le traitement statistique est limité par sa structure polynomiale. Néanmoins, les résultats montrent un évident manque de performances vis-à-vis du degré de déprotéinisation. Les possibilités envisagées à ce stage de l'étude sont un lavage chimique complémentaire ou l'allongement de la durée d'hydrolyse enzymatique. La seconde hypothèse est étudiée dans la section IV.3. Si aucun traitement complémentaire n'est pratiqué, le produit peut être vendu comme intermédiaire pour la fabrication du chitosan ou d'un autre dérivé de la chitine.

IV.3. Élargissement du domaine d'étude pour la déprotéinisation

IV.3.1. Augmentation de la concentration en pepsine

Les précédents résultats et leurs conclusions invitent à poursuivre les expériences dans le sens de l'augmentation de la concentration en pepsine, afin d'améliorer la déprotéinisation. Deux concentrations sont expérimentées, 25 % et 41 % de pepsine par rapport à la quantité de protéines (soit près de 3 % et 5 % par rapport au poids de matière première). Au regard des précédents résultats, la température est fixée à 40 °C et la taille de fragments d'exosquelette est inférieur à 1 mm. La cinétique est également suivie six heures.

La figure III.22 montre les cinétiques obtenues avec 25 % de pepsine. Le rendement massique atteint 30,3 g/100 g après 6 h d'hydrolyse. Le résidu solide contient 0,3 g/100 g de minéraux et près de 3,5 g/100 g de protéines. Par le bilan massique, la quantité de chitine atteindrait donc 26,5 g/100 g, or le nettoyage chimique par NaOH estime le degré de pureté à 87,2 %, ce

qui correspond à la même quantité de chitine de 26,5 g/100 g. Les différentes méthodes de quantification de la chitine convergent bien vers le même résultat (Cf. Fig.II.11). Bien que les performances de déprotéinisation et déminéralisation soient améliorées par rapport au plan d'expérience, le rapport C/N, non illustrée ici, atteint 5,7. Cette valeur est légèrement inférieure au rapport C/N de l'expérience VII, soit 5,9. Ceci montre le manque de sensibilité de l'analyse par rapport à la faible amélioration de la purification de la chitine.

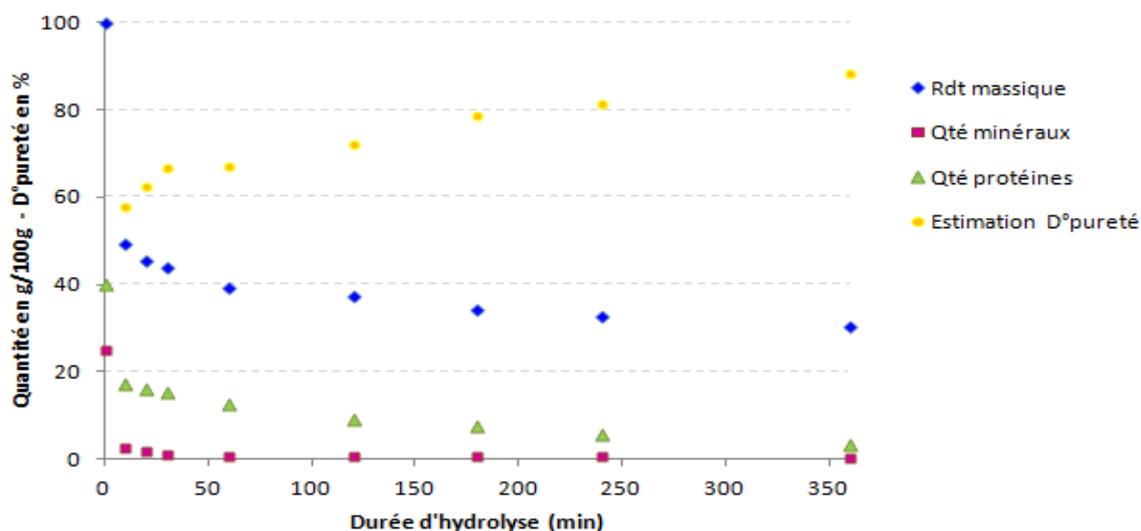


Fig.III.22 : Hydrolyse enzymatique par 25 % de pepsine ($T^{\circ} 40^{\circ}C$ – Taille < 1 mm)

Comme cela avait déjà été observé pour le plan d'expérience, les cinétiques du rendement massique et de la déprotéinisation semblent s'atténuer lentement. Celle de la déminéralisation est rapide les 10 premières minutes, puis ralentit. Au-delà de 30 min, la quantité de minéraux résiduels évolue peu. Les mêmes constatations sont valables pour l'hydrolyse suivante, par 41 % de pepsine (Fig.III.23).

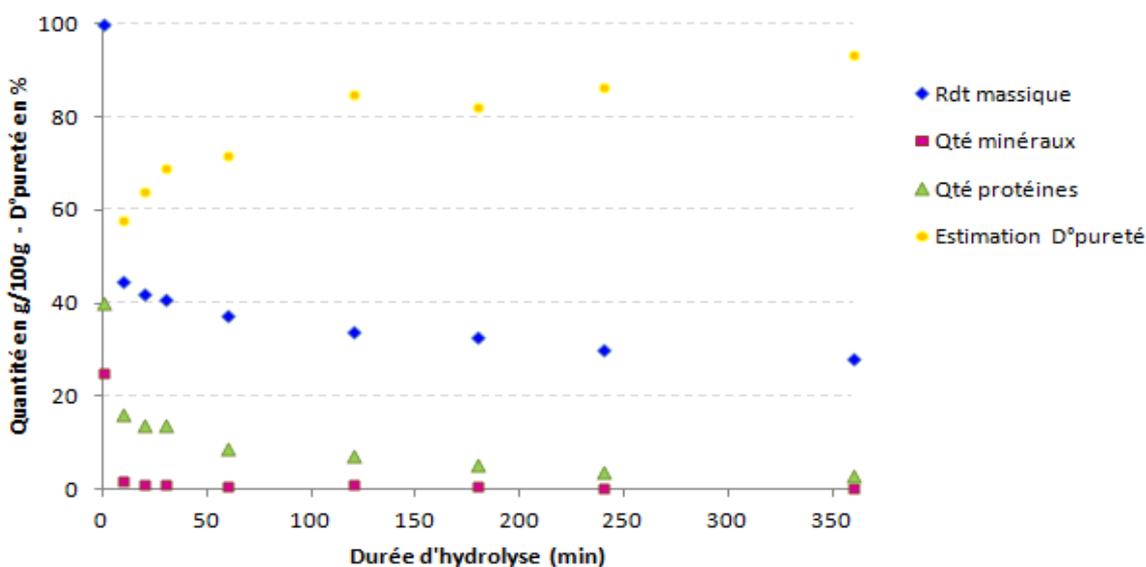


Fig.III.23 : Hydrolyse enzymatique par 41 % de pepsine ($T^{\circ} 40^{\circ}C$ – Taille < 1 mm)

Après 6 h d'hydrolyse, le rendement massique est de 28,2 g/100 g. Le résidu solide contient 0,2 et 2,9 g/100 g de minéraux et protéines respectivement. Le degré de pureté, obtenu par lavage au NaOH, est estimé à 93,2 % et le rapport C/N atteint 6,2. Ces valeurs indiquent une meilleure purification de la chitine par rapport aux précédentes cinétiques. Les méthodes de quantification de la chitine ne convergent pas toutes vers la même valeur (Fig.III.24), contrairement à la cinétique à 25 % de pepsine (Fig.II.11), ce qui confirme les limites de chacune. Néanmoins, elles semblent indiquer une stabilisation de la quantité de chitine autour de 26,5 g/100 g après 6 h d'hydrolyse enzymatique.

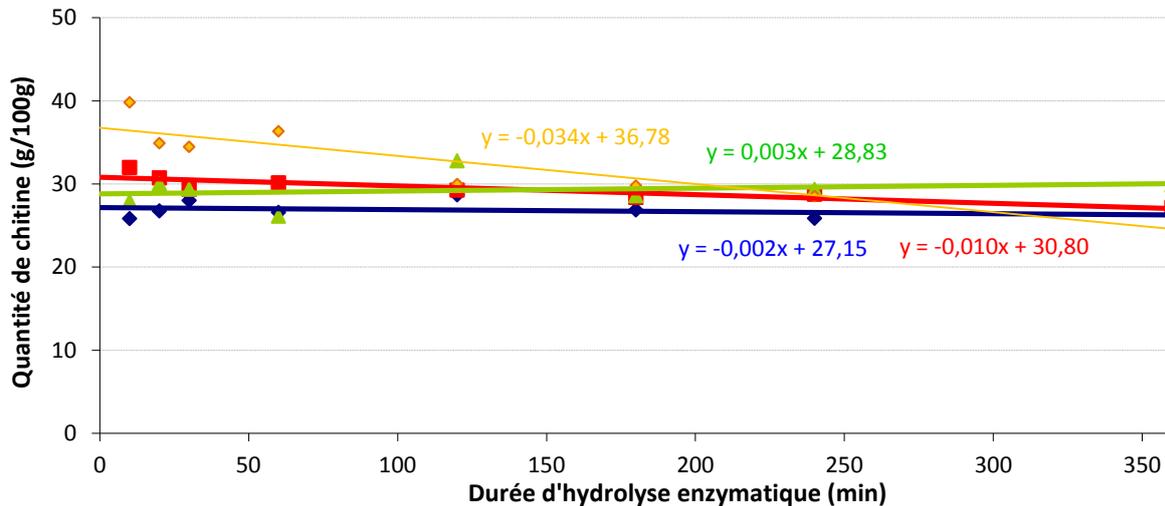


Fig.III.24 : Comparaison des méthodes de quantification de la chitine (en rouge, via le bilan massique ; en bleu, via le lavage au NaOH ; en vert, via l'analyse élémentaire ; en orange, via le C_p déterminé par CPG)

IV.3.2. Augmentation de la durée d'hydrolyse

La durée d'hydrolyse de 6 h est-elle suffisante ? Au regard des résultats précédents, ce facteur a un impact certain et la cinétique de déprotéinisation ne montre pas de stabilisation finale. Ce qui laisse supposer que la déprotéinisation peut être améliorée par un allongement de la durée d'hydrolyse enzymatique. La figure III.21 expose les résultats du traitement des exosquelettes de crevettes par 25 % de pepsine pendant 12 h, comparé à ceux obtenus après 6 h d'hydrolyse avec la même concentration en pepsine.

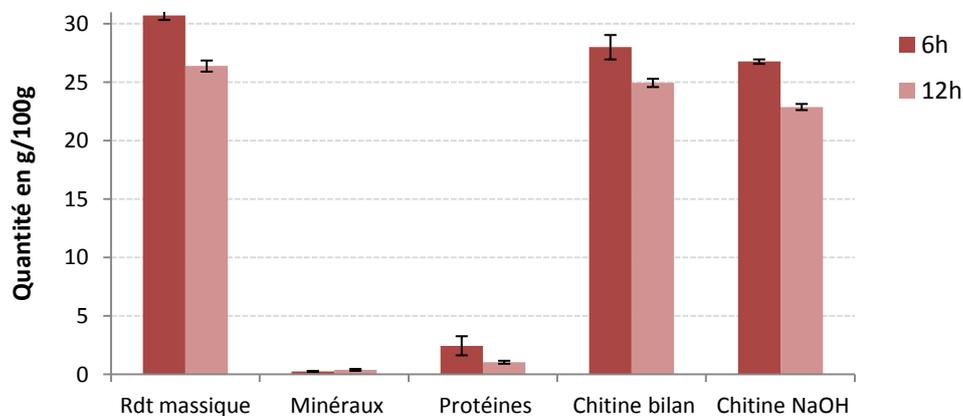


Fig.III.25 : Comparaison des extractions par 25 % de pepsine entre 6 h et 12 h d'hydrolyse (n=3)

La figure III.25 montre que le degré de déminéralisation n'est pas amélioré par l'allongement de la durée d'hydrolyse. La quantité de protéines résiduelle semble diminuer, toutefois l'analyse de variance invite à rester prudent sur ce point. En revanche, le rendement massique après 12 h d'hydrolyse est nettement amélioré, avec 26,4 g/100 g, il gagne 4,3 g/100 g par rapport à l'extraction de 6 h. Cette perte de masse est-elle liée à une augmentation de la pureté en chitine ou une perte de chitine ? Le degré de pureté en chitine est estimé via le lavage au NaOH à $88,1 \pm 2,0$ %, ce qui correspond à une quantité de chitine de 22,9 g/100 g. Le bilan massique indique une quantité de chitine de $24,3 \pm 0,2$ g/100 g. Dans les deux cas, ces valeurs sont significativement plus faibles que celles atteintes après 6 h d'hydrolyse. Le rapport C/N est de $6,33 \pm 0,04$, peu différent du rapport C/N après 6 h d'hydrolyse. Ceci semble aller dans le sens d'une faible augmentation de la pureté en chitine mais d'une perte possible de chitine.

V. Modélisation

V.1. Introduction

Les cinétiques du plan d'expérience et celles hors du plan d'expérience (25 et 41 % de pepsine) sont exploitées pour modéliser la déminéralisation et la déprotéinisation. Les expériences sans enzymes sont également utilisées. Ceci représente au total 316 résultats par réponses étudiées. L'ensemble de ces données est traité à l'aide du logiciel MATLAB[®] 6,5. Les simulations et estimations paramétriques sont écrites par des routines spécifiques. Des exemples de modèles de référence, qui peuvent inspirer notre étude, vont être décrits maintenant.

(a) Modèle de référence

Le modèle classique, généralement admis pour les cinétiques enzymatiques, est l'équation de « Michaëlis-Menten » (III.7) :

$$v_i = \frac{v_{\max} * S}{K_m + S} \quad (\text{III.7})$$

v_i : vitesse initiale, v_{\max} : vitesse maximale, S : concentration en substrat, K_m : constante de Michaëlis-Menten

(b) Modélisation en fonction de la température

La loi d'Arrhénius exprime l'influence de la température (T^\bullet) et de l'énergie d'activation (E) sur la cinétique (III.8)

$$\mu(T^\circ) = a_2 e^{\left(\frac{-E_1}{RT^\circ}\right)} - a_1 e^{\left(\frac{-E_2}{RT^\circ}\right)} - b \quad (\text{III.8})$$

où b est une constante, a_1 et a_2 sont des constantes particulières, dite pré-exponentielles ou facteurs de fréquence, car elles tiennent compte de la fréquence de collision et des effets stériques. R est la constante des gaz parfait. D'après cette loi, les réactions dont les énergies d'activation sont les plus faibles ont les cinétiques les plus rapides et inversement.

(c) Modélisation en fonction de la taille des fragments

La taille des fragments du substrat peut également être modélisée. Le rapport surface/volume (S/V) des fragments est déterminant car le rendement de conversion est d'autant plus élevé que la surface de contact est accessible aux enzymes. Par un mécanisme d'adsorption, les enzymes se fixent près du site à lyser avant d'être active (Fig.III.26). Movagarnejad et al. (2000) expliquent comment ce rapport influence l'évolution de la taille des particules (III.9) :

$$\frac{d\text{Taille des fragments}}{dt} = K_e * V_r * C_s \left(\frac{1}{\rho_s} \right) \left(\frac{S}{V} \right)_P \quad (\text{III.9})$$

K_e est une constante, V_r est le volume du réacteur, C_s et ρ_s sont respectivement la concentration et la densité

Généralement, la taille des fragments diminue progressivement au cours de la réaction. Vauchel (2007) a étudié l'évolution de la taille des morceaux d'algues *L. digitata* pendant l'extraction de l'alginate. Elle propose une cinétique du 1^{er} ordre (III.10) :

$$\frac{dD}{dt} = K_D(D - D_{\min})^2 \quad (\text{III.10})$$

D représente le diamètre moyen des morceaux d'algues (en mm), D_{\min} et D_0 sont les diamètres moyens finaux et initiaux respectivement. K_D est le facteur associé à la cinétique de déstructuration des algues.

Dans ces deux exemples, la taille est une variable en réponse à la réaction et non un facteur. Il est également possible de modéliser la réduction des DP des polysaccharides. Il faut distinguer le rapport S/V et l'accès aux sites de coupures, les deux sont liés et ont généralement un effet sur la cinétique. De plus, pour l'hydrolyse des polymères, telle que la chitine, on sait que des zones amorphes et cristallines se répartissent dans la matière première. Les zones amorphes sont davantage accessibles aux enzymes et donc plus rapidement hydrolysées. Lorsque cette zone est hydrolysée, l'indice de cristallinité augmente. Puis les enzymes hydrolysent les zones cristallines (Bansal et al. 2009). Par conséquent, le temps d'adsorption entre l'enzyme et son substrat (Fig.III.26) est différent pour ces deux étapes et complexifie la modélisation.

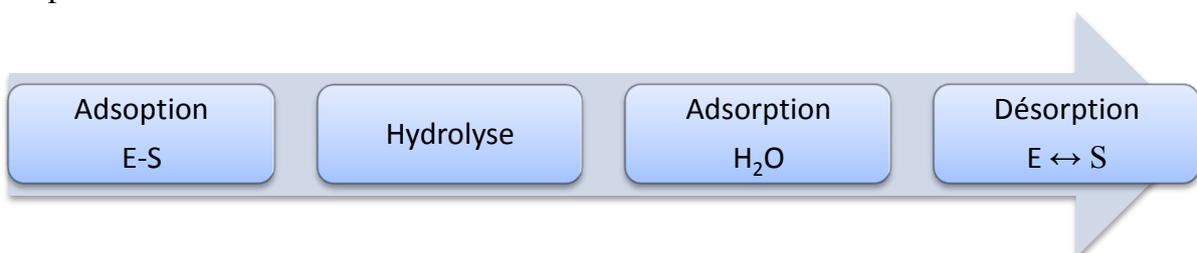


Fig.III.26 : Étapes du mécanisme d'hydrolyse enzymatique (Hosseini et al. 2011)

(d) Modélisation en fonction de la durée d'hydrolyse

Le modèle classique de la durée de la réaction est généralement décrit par l'équation (III.11) :

$$\frac{dS}{dt} = -kS \quad (\text{III.11})$$

S est la concentration en substrat, k la constante représentative de la vitesse de cinétique et t le temps

Cette équation s'adapte en fonction des spécificités des réactions. D'après Bansal et al. (2009) les hydrolyses enzymatiques constituent un système de réactions hétérogènes qui répondent à une combinaison de cinétiques. C'est généralement le cas pour des hydrolyses enzymatiques appliquées à une matière première complexe telle que l'exosquelette de crustacés. Bansal et al (2009) rapportent que ces systèmes constituent un ensemble de cinétiques qui respectent un ordre n , dont les constantes de vitesse dépendent du temps et dont la production n'est pas uniforme. La nature fractale de ces systèmes augmente à mesure que les obstacles à l'accès aux sites de coupures apparaissent. Valjamae et al. (2003) modélisent la production de P (III.12) :

$$P(t) = P_0 \times (1 - e^{-kt^{1-h}}) \quad (III.12)$$

h représente l'exposant de la cinétique fractale, h et k sont des constantes empiriques.

V.2. Modélisation de la déminéralisation

Pour établir le modèle adéquat, la démarche consiste à composer une équation qui tient compte des principes décrits ci-dessus. Elle est ensuite confrontée aux résultats obtenus. Le « *sse* » (sum square error) et le « *rmse* » (root-mean-square error) sont des indicateurs relatifs de validation du modèle par les résultats observés. Soit M la quantité de minéraux (en g/100g). Les valeurs des réponses ont été normalisées pour cette modélisation (Cf. Tab.III.2). La cinétique de déminéralisation peut s'écrire :

$$\frac{dM}{dt} = -k_m(T^\circ, [Pep], T_a) \times M \quad (III.13)$$

D'après les précédentes observations, deux phases semblent caractériser la cinétique de déminéralisation. Par conséquent, l'équation est composée de deux compartiments, M_1 et M_2 :

$$M = M_1 + M_2 \quad (III.14)$$

$$\frac{dM_1}{dt} = k_{m1}(T^\circ, [Pep], T_a) \times M_1 \quad \text{et} \quad \frac{dM_2}{dt} = k_{m2}(T^\circ, [Pep], T_a) \times M_2 \quad (III.15)$$

✓ Le premier modèle proposé, nommé M_A , (Fig.III.27) tient compte de tous les facteurs (taille des fragments, concentration, température), à travers deux compartiments (III.16). Les valeurs exploitées ont été normalisées :

$$\left. \begin{aligned} K_{m1} &= -1.68 + 5.2 \times T_a - 2.57 \times T^\circ - 2.03 \times [Pep] \\ K_{m2} &= -1.24 + 0.98 \times T_a - 0.09 \times T^\circ - 0.01 \times [Pep] \\ M_1(0) &= 18.45 \quad \text{et} \quad M_2(0) = 6.55 \end{aligned} \right\} \quad (III.16)$$

Facteurs	Cinétique rapide (M_1)	Cinétique lente (M_2)
Taille des fragments	0,31	0,79
Température	0,15	0,07
Concentration en pepsine	0,13	0,01

Tab.III.11 : Impact relatif des variables sur les deux composantes du modèle M_A

Ce modèle explique que la vitesse de disparition des minéraux est supérieure au cours de la

première étape M_1 , par rapport à la seconde M_2 . Par exemple, pour les expériences aux conditions intermédiaires (0,0,0), le k_{m1} est supérieur à k_{m2} , soit 16,8 et 1,2 h^{-1} respectivement. De plus, le tableau III.11 montre que la taille des fragments agit sur les cinétiques de façon marquée. Son impact relatif domine ceux des autres facteurs, avec 31 % et 79 % pour les composantes M_1 et M_2 respectivement. À l'inverse, l'impact relatif de la concentration en pepsine est très faible, 13 % et 1 % respectivement.

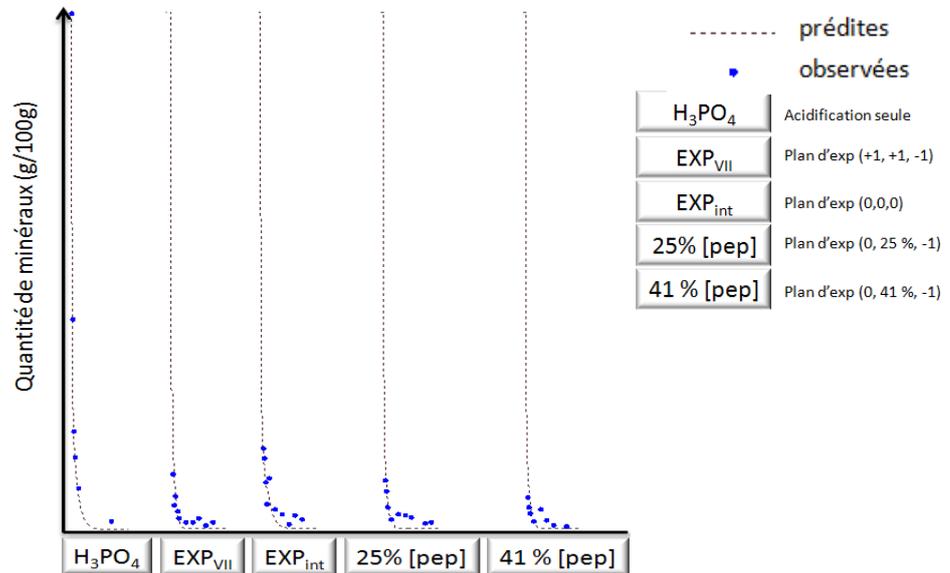


Fig.III.27 : Confrontation entre le modèle M_A et les mesures observées, $sse = 136$ et $rmse = 1,01$

Sur la figure III.27, l'axe des abscisses représente la durée d'hydrolyse enzymatique. Pour cinq cinétiques (sans enzyme, l'expérience VII et intermédiaire du plan d'expérience, avec 25 et 41 % de pepsine), le modèle M_A est comparé aux valeurs observées. On observe une bonne concordance entre les deux. Elle se révèle plus élevée pour l'expérience VII (petite taille de fragments, forte concentration et température 43 °C) et lorsque la concentration en pepsine atteint 41 %.

✓ Ce modèle peut être perfectionné en considérant une transition plus progressive entre la composante rapide et la composante lente de la déminéralisation. Pour décrire ce phénomène, il est possible de retenir un modèle du premier ordre (III.17) :

$$K_m = -0.46 \times (1 - 0.99 \times T_a + 0.48 \times T_a^2) \times M \quad (\text{III.17})$$

Ce modèle, M_B , présente un sse et un $rmse$ plus élevés, 205 et 1,21 respectivement. La figure III.28 montre une meilleure concordance entre le modèle et les mesures réellement observées. Pour ce modèle, les cinq expériences témoins ne semblent pas être représentatives de l'ensemble des données traitées. Par ailleurs, ce modèle ne fait intervenir que le facteur taille car le précédent modèle indiquait leur faible impact.

Enfin, la structure modèle M_B est liée à l'évolution de la quantité de minéraux dans le milieu. Par conséquent, la courbe associée au modèle M_B décroît moins rapidement que celle du modèle M_A , du fait de la raréfaction de la quantité de minéraux.

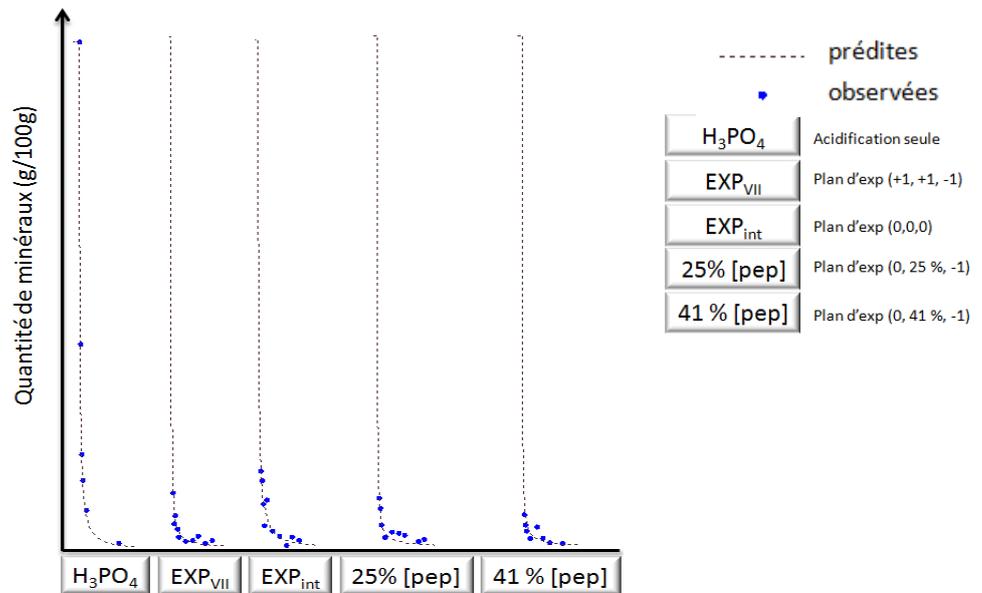


Fig.III.28 : Confrontation entre le modèle M_B et les mesures observées, $sse = 205$, $rmse = 1,21$

✓ Un autre modèle, M_C , est établi en intégrant à nouveau l'ensemble des facteurs. La structure conserve le principe du polynôme associé à la quantité de minéraux. En réalité il s'agit de trois polynômes, un par facteur étudié. Le dernier terme « M » indique également que la cinétique de déminéralisation est liée à la quantité de minéraux présents (III.18) :

$$\frac{dM}{dt} = 0.05 \times (1 + 4.53M) \times (1 - 1.65 \times T_a - 0.89 \times T_a^2 + 0.19 \times T^o + 1.33 \times T^{o2} - 0.02 \times [pep] + 0.68 \times [pep]^2) \times M \quad (III.18)$$

La figure III.29 compare le modèle de prédiction aux valeurs mesurées. Le sse et le $rmse$ sont meilleurs, respectivement 118 et 0,93. Cependant, les cinétiques observées sont davantage éloignées du modèle par rapport au précédent modèle M_B , pour les cinq cinétiques témoins.

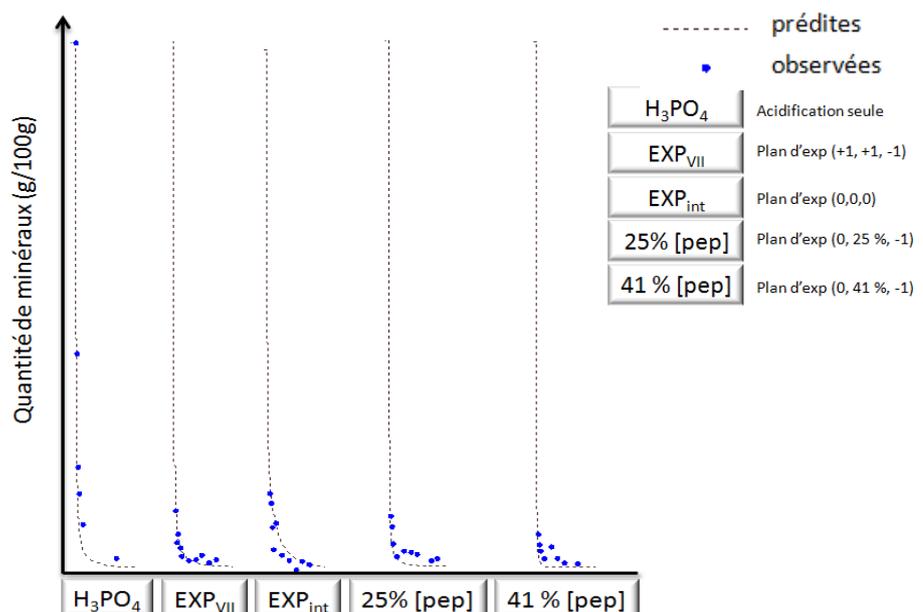


Fig.III.29 : Confrontation entre le modèle C et les mesures observées, $sse = 118$ et $rmse = 0,93$

L'équation III.18 et le tableau III.12 montre le poids de chaque facteur. La taille initiale des fragments est le facteur dominant, suivi de la température. L'influence de la concentration est très faible. Tous sont directement dépendants de la quantité de minéraux présents. Lorsqu'elle diminue, la cinétique ralentie.

Facteurs	Pondération
Taille des fragments	2,54
Température	1,33
Concentration en pepsine	0,70

Tab.III.12 : Impact relatif des variables sur le modèle M_C

Pour conclure, le meilleur modèle pour prédire la déminéralisation semble être le modèle M_C . Il confirme les conclusions apportées par l'analyse statistique du plan d'expérience concernant l'impact négligeable de la concentration en pepsine et le faible impact de la température. La taille initiale des fragments constitue le principal effet sur la cinétique de déminéralisation.

V.3. Modélisation de la déprotéinisation

La même démarche est pratiquée pour déterminer le modèle optimal de la déprotéinisation. Soit P la quantité de protéines (en g/100 g). Les variations de mesures des protéines se sont révélées importantes et constituent une difficulté majeure pour construire le modèle précis.

La cinétique de déprotéinisation devrait respecter la formule générale suivante :

$$\frac{dP}{dt} = k_m(T^\circ, [Pep], T_a) \times P \quad (\text{III.19})$$

La vitesse k_m peut être affinée par des fonctions spécifiques à cette réaction. Les modèles simples à un seul compartiment ont présentés des *sse* très élevés, autour de 2 130 (Tab.III.13). Des fonctions sigmoïdes ont été ajoutées. Ce type de fonction, de forme $x^n/(x^n+a^n)$ et d'ordre n , est souvent lié au comportement d'enzymes allostériques. Ces enzymes sont sensibles à une modulation de leurs activités par des molécules appelés des effecteurs. Le *sse* est alors amélioré, il atteint 1 585. Par la suite, les recherches se sont orientées vers un modèle à deux compartiments P_1 et P_2 :

$$P = P_1 + P_2 \quad (\text{III.20})$$

Enfin, la fonction sigmoïde, associée au comportement allostérique, est intégrée dans la structure en deux composantes. Le *sse* atteint alors 1073. Notons que les valeurs exploitées ont été normalisées pour faciliter la modélisation, exceptées la concentration en pepsine lorsqu'elle intègre la fonction sigmoïde. Le tableau III.13 présente la progression de la démarche vers le modèle adéquat et leur *sse*, en fonction des simulations :

Conception du modèle	Sse
1 compartiment : f polynomiales (T°, [pep] et Taille)*P	2133
1 compartiment : f polynomiales (T°, Taille) et f ([pep] et P) d'ordre 1	2135
1 compartiment : f polynomiales (T°, Taille) et f sigmoïdes ([pep] et P) d'ordre 0,5 à 2,7 pour P	2126 à 1276
2 compartiments : f linéaires (T°, [pep] et Taille)*P	1796
2 compartiments : f linéaires (T° et Taille)*P et sigmoïdes ([pep]) d'ordre 1	1443
2 compartiments : f polynomiales (T° et Taille)*P et sigmoïdes ([pep]) d'ordre 1	1108
2 compartiments : f polynomiales (Taille)*P et sigmoïdes ([pep]) d'ordre 1	1127
2 compartiments : f polynomiales (Taille)*P, sigmoïdes [pep] (n=1) et P (n ₁ =2,5 et n ₂ =1,6)	1087
2 compartiments : f polynomiales (Taille)*P, sigmoïdes [pep] (n=1) et P (n ₁ =1,1 à 4,3 et n ₂ =0)	1072

Tab.III.13 : Description détaillée des recherches de modélisation de la déprotéinisation

Le tableau III.13 montre une amélioration du sse par des modèles à deux compartiments et par l'introduction des fonctions sigmoïdes, appliquées à la concentration en pepsine et à la quantité de protéines. Le tableau III.13 ne montre qu'un échantillon des modèles testés à partir de nos observations, qui ont permis de préciser les constantes des fonctions sigmoïdes.

Le modèle retenu comporte deux compartiments, chacun constitué :

- d'une fonction polynomiale, associée à la taille,
- d'une fonction de type Monod, associée à la concentration en pepsine,
- d'une fonction sigmoïdes d'ordre $n_1=1,5$ et $n_2=1,6$, associée à la quantité de protéines.

Soit (III.21) :

$$\left. \begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} &= [-0.35 + 0.33 \times T_a - 0.10 \times T_a^2] \times \frac{[Pep]}{[Pep] + 0.45} \times \frac{P_1^{2.5}}{P_1^{2.5} + 5.88^{2.5}} \times P_1 \\ \frac{dP_2}{dt} &= [-10.91 + 10.73 \times T_a - 0.80 \times T_a^2] \times \frac{[Pep]}{[Pep] + 0.10} \times \frac{P_1^{1.6}}{P_1^{1.6} + 5.88^{1.6}} \times P_2 \\ P_1(0) &= 20.05, \quad P_2(0) = 12.24, \quad \text{donc } P(0) = 32.29 \end{aligned} \right\} \quad (III.21)$$

La température s'est révélée être négligeable pour cette modélisation. La quantité de protéines à l'instant t_0 de l'hydrolyse enzymatique est estimée à 32,29 g/100 g par le modèle, tandis que les mesures observées en laboratoire se situent entre 29 et 38 g/100 g. Le modèle semble donc satisfaisant. Il est illustré par la figure III.30 :

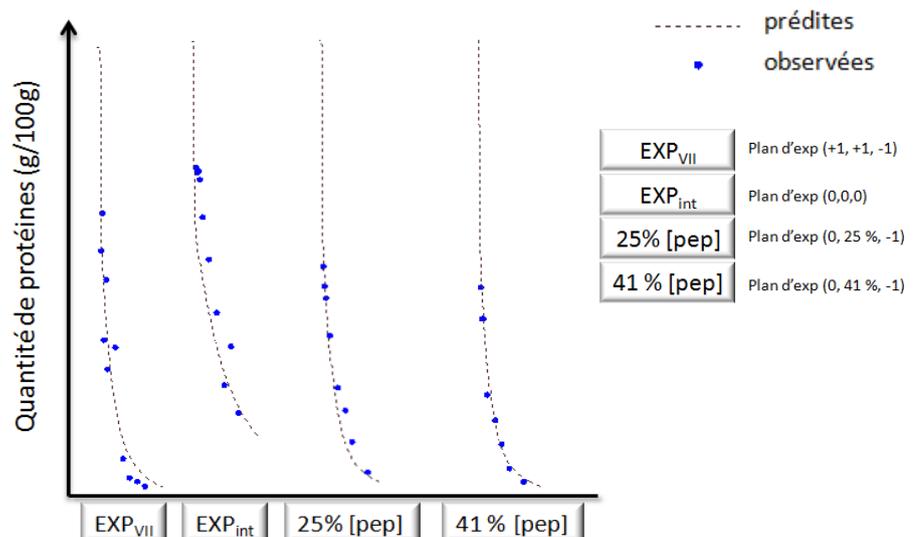


Fig.III.30 : Confrontation entre la déprotéinisation prédite et les mesures observées, sse = 1087 et rmse = 3,14

Le modèle sélectionné dépend principalement de la taille initiale des fragments de matière première et il est modulé par la concentration en pepsine. La température n'intervient pas, comme l'avait conclu l'analyse statistique de la section IV. Enfin, une allostérie négative semble limiter la déprotéinisation. Elle est liée à la quantité de protéines et plus exactement aux liaisons peptidiques, substrats de la pepsine. Elle est liée soit au manque d'accessibilité des liaisons peptidiques résiduelles, soit à une rétro-inhibition des peptides libérés.

La présence de sites allostériques sur les enzymes a été mise en évidence dès 1963 par Monod, Changeux et Jacobs. Les effecteurs qui agissent sur ces sites ont soit un effet coopératif, soit inhibiteur (Monod et al. 1965). On distingue les effecteurs homotropes¹⁹ et hétérotropes, dont la nature différente du substrat implique une affinité inférieure (Koshland, 1970). Ils affectent les cinétiques enzymatique comme l'illustre les figures III.31.a et III.31.b :

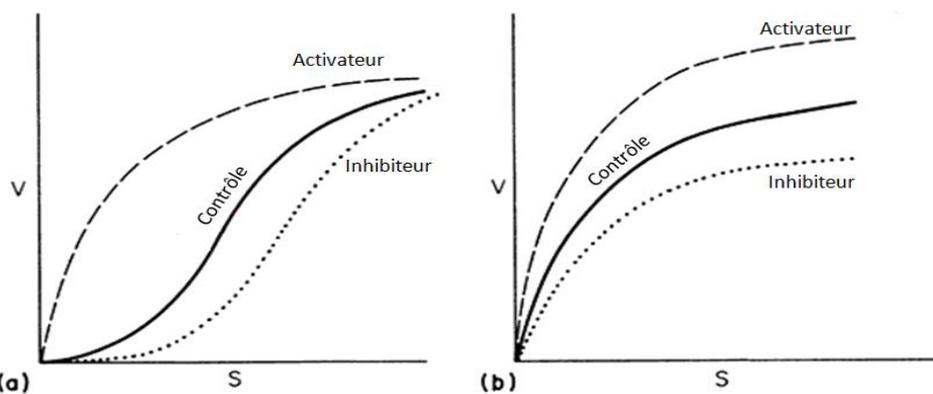


Fig.III.31 : Effets inhibiteur et activateur selon l'affinité avec les effecteurs forte (a) ou faible (b)

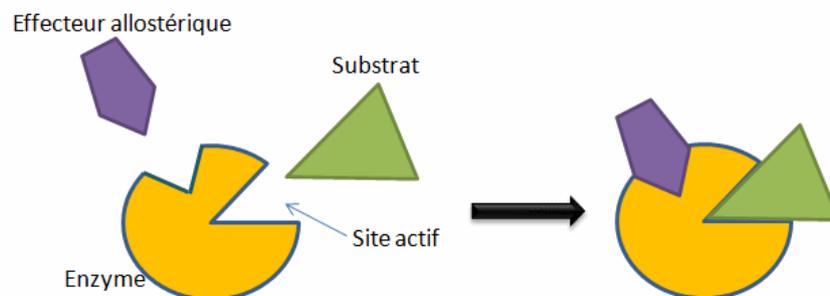


Fig.III.32 : Interaction et formation du complexe ENZYME-SUBSTRAT-EFFECTEUR

L'existence de sites modulateurs à proximité du site actif est illustrée par la figure III.32. Lorsque l'effecteur comble le site modulateur, des changements de conformation modifient l'activité de l'enzyme. Atkins (2005) décrit la représentation classique de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat comme étant une hyperbole. En présence d'effecteurs allostériques, la cinétique est représentée par une sigmoïde. Bien que certains inhibiteurs de la pepsine soient connus, telle que la globuline-11S (Rassam et Laing, 2006) et la pepstatine (Fruton, 1976), peu d'études font part des effets allostériques. Turk (2006) évoque le rôle des glycosaminoglycanes sur la régulation de protéases telle que l'héparine sur des thrombines²⁰. Or ces composés sont également des polysaccharides.

¹⁹ De même nature que le substrat

²⁰ Protéases responsables de la coagulation du sang

D'après la comparaison entre nos résultats et les modèles classiques, nous sommes en présence d'effets allostériques faibles à l'encontre de la protéolyse. Nous ne connaissons pas la nature des effecteurs. L'hypothèse la plus vraisemblable est d'être en présence d'effecteurs de nature protéique. Leur conformation partagerait des similitudes avec les acides aminés aromatiques reconnus par la pepsine. Par conséquent, le modèle sélectionné parmi tous les modèles étudiés est celui qui favorise l'effet allostérique associé à la quantité de protéines P , dans les deux compartiments. En poursuivant les investigations, un nouveau modèle basé sur la présence de l'allostérie uniquement dans le premier compartiment, a présenté un meilleur *sse*. Notons, lorsque la concentration en pepsine augmente de 15 % à 41 %, que le degré de déprotéinisation, après 6 h d'hydrolyse, augmente peu, de 91,3 % à 92,8 %. Ceci confirmerait l'hypothèse selon laquelle l'ajout de pepsine, au-delà d'un seuil, ne permette plus d'améliorer la déprotéinisation. Le modèle s'écrit alors :

$$\left. \begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} &= [-12.96 + 14.9 \times Ta - 6.54 \times Ta^2] \times \frac{[Pep]}{[Pep] + 9} \times \frac{P_1^{2.1}}{P_1^{2.1} + 5.88^{2.1}} \times P_1 \\ \frac{dP_2}{dt} &= [-20.74 + 19.68 \times Ta] \times \frac{[Pep]}{[Pep] + 2} \times P_2 \\ P_1(0) &= 21.28, P_2(0) = 11.01, \text{ donc } P(0) = 32.29 \end{aligned} \right\} \quad (III.22)$$

La figure III.33 illustre la confrontation entre le modèle et les valeurs observées :

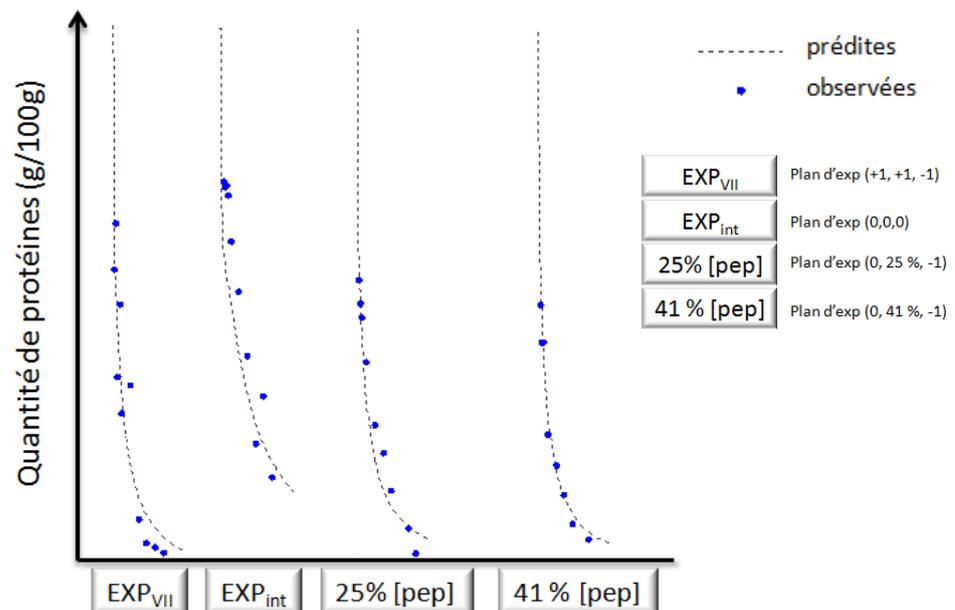


Fig.III.33 : Confrontation entre la déprotéinisation prédite et les mesures observées, *sse* = 1072 et *rmse* = 3,08

L'équation III.22 s'avère conforme aux mesures observées (*rmse* = 3,08), notamment lorsque la concentration en pepsine augmente (Fig.III.33). Au regard des incertitudes de mesures, la déprotéinisation est donc correctement modélisée par une structure qui repose sur deux composantes. Chacune tient compte de l'effet de la taille des fragments de matière première d'après une structure polynomiale du 1^{er} et du 2nd ordre, et de la concentration en pepsine, d'après une structure de type Monod. La fonction allostérique apparaît uniquement dans la première composante.

VI. Choix des conditions optimales

Le choix des conditions de production de la chitine est guidé par un double objectif : atteindre les caractéristiques du polymère exigées par le cahier des charges d'une part, et maximiser la rentabilité du procédé d'autre part. On distingue plusieurs critères pour caractériser la qualité de la chitine. En premier lieu, ils concernent directement ou indirectement le degré de pureté de la chitine :

- couleur apparente du produit extrait
- teneur en minéraux résiduels
- teneur en métaux lourds
- teneur en humidité
- rapport C/N
- teneur en fraction insoluble

Par exemple, le grade médical correspond aux teneurs résiduelles en minéraux et métaux lourds minimales (respectivement $< 0,3 \%$ et $< 10 \text{ ppm}$). La couleur du produit doit tendre vers le blanc et le pH se situer autour de 7 (Annexe B). Les autres critères qualitatifs sont principalement :

- le degré d'acétylation
- le degré de polymérisation (paramètre lié à la viscosité)
- l'indice de polymolécularité
- l'indice de cristallinité

Ces critères ont une importance variable en fonction du domaine d'application (Cf. Chapitre 1.III). Nos produits ont tous présenté des degrés d'acétylation et de polymérisation élevés. Nous nous concentrerons donc sur le degré de pureté en chitine. Les impuretés sont en majorité des minéraux et des protéines. Or, nous disposons des modèles d'optimisation des degrés de déminéralisation et de déprotéinisation, établis à la section précédente.

Les facteurs utilisés pour optimiser le degré de pureté en chitine modulent également le coût du procédé. Il s'agit de la consommation en enzyme, en énergie pour chauffer le temps de l'hydrolyse et celle liée au broyage des coproduits pour réduire leur taille. D'autres contraintes économiques affectent la rentabilité du procédé, telles que le prix de la matière première et les consommables (réactifs).

Un compromis entre le degré de pureté maximal et le coût minimal doit être déterminé. Un modèle a donc été développé pour optimiser les conditions opératoires en tenant compte de l'ensemble des contraintes de rentabilité et de productivité. Ce modèle se décline en deux fonctions.

- L'une est liée au prix de vente de la chitine, D , qui dépend de son degré de pureté. Cette fonction repose sur les deux modèles de déminéralisation et de déprotéinisation sélectionnés précédemment (équations III.18 et III.22).

- La seconde fonction, C , est liée au coût du procédé.

Le rapport des deux aboutit à la fonction J :

$$J = \frac{D}{C} = \frac{f_B[(f_{d\acute{e}min} + f_{d\acute{e}prot}) \times f_{rdt}]}{f_C[f_{dur\acute{e}e} + f_{[enz]} + f_{\Gamma a + autres}]} \quad (III.23)$$

Où $f_{d\acute{e}min}$ et $f_{d\acute{e}prot}$ correspondent aux modèles sélectionnés précédemment ; $R = 25 + P + M$ correspond au rendement massique de chitine. P et M correspondent respectivement la masse de protéines et de minéraux résiduels :

$$\%P = \frac{P}{R} \times 100 \quad \%M = \frac{M}{R} \times 100 \quad (III.24)$$

C est la somme des termes associés à chaque coût : elle tient compte de la durée d'hydrolyse, de la concentration en enzyme, de la granulométrie des fragments de matière première et le reste des paramètres est regroupé en un terme global (comprenant le prix des réactifs, de la matière première, des diverses consommations, etc.). D correspond à deux fonctions arctangentes, associées à la déminéralisation et de la déprotéinisation. L'ensemble est multiplié par le rendement en chitine (Equation III.23). La fonction J est décrite par le graphique suivant:

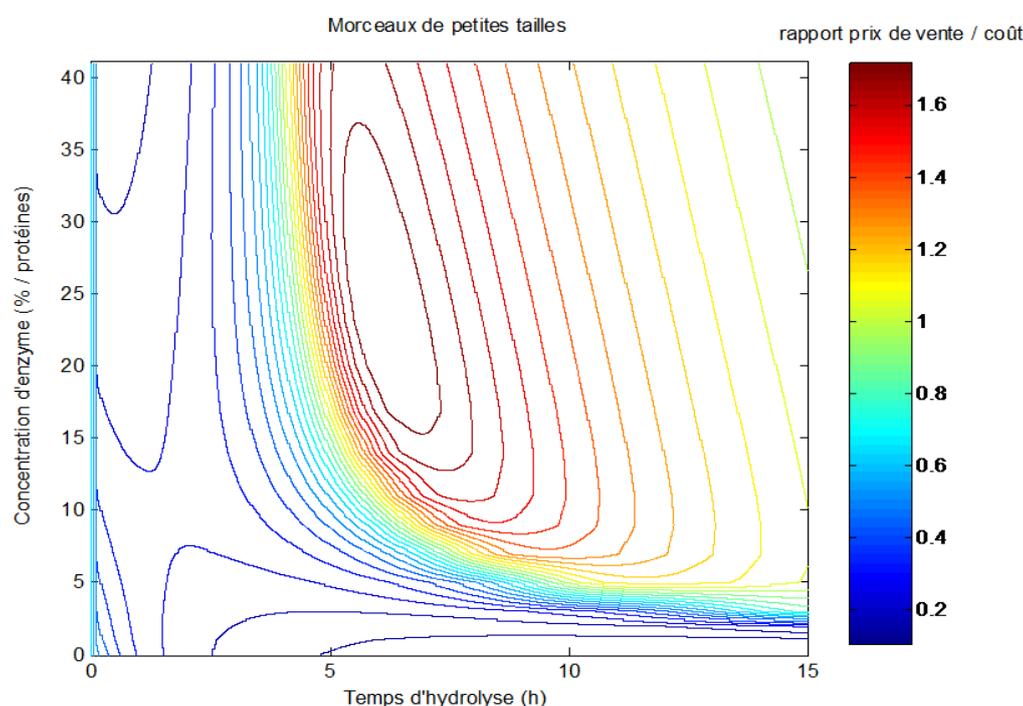


Fig.III.34 : Représentation du prix de vente de la chitine en fonction du coût de production (J)

Nous avons fait le choix d'optimiser directement le paramètre « taille » en sélectionnant les fragments de cuticule inférieurs à 1 mm. La figure III.34 illustre en rouge les conditions pour optimiser la fonction J . Par conséquent, les conditions qui concilient les deux objectifs, requièrent 6 h d'extraction enzymatique par 25 % de pepsine à 40 °C (température non illustrée ici). Cette hydrolyse enzymatique servira de référence pour la suite de l'étude.

VII. Composition de la phase liquide et balance massique

VII.1. Bilan massique global des minéraux

À l'issue de l'hydrolyse enzymatique, la phase liquide est filtrée, neutralisée par de la soude pure, lyophilisée et stockée. L'analyse de la composition des produits révèle une teneur en humidité comprise entre 2 et 7 %. L'extrait sec est essentiellement composé de minéraux et des dérivés protéiques. La composition est analysée à partir des produits issus de l'hydrolyse de référence (25 % de pepsine, 40 °C, fragments inférieurs à 1 mm). La part de sels minéraux décroît au cours du temps de 75 à 65 %. Celle des protéines, estimée également par le dosage des acides aminés par CPG, croît de 7 à 13 % (Fig.III.35). Le reste est composé de glucides et de lipides.

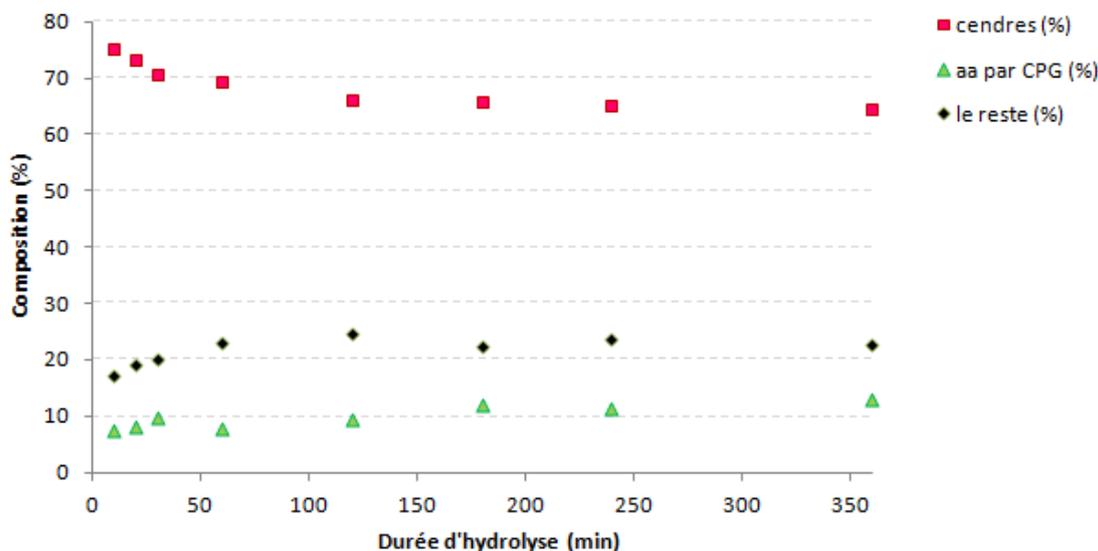
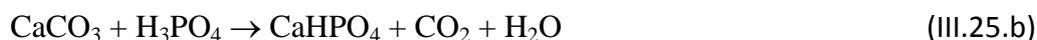


Fig.III.35 : Cinétique de la composition de la phase soluble – Hydrolyse de référence

Les minéraux dissous lors de la réaction sont à l'origine d'une partie de la part minérale. L'ajout de soude pour la neutralisation de la phase soluble, constitue une seconde source de sels minéraux. D'après les équations des réactions chimiques (III.24 a à c), à partir de l'acide phosphorique et du carbonate de calcium, se forme soit du bis-dihydrogénophosphate de calcium ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), du phosphate de calcium de formule CaHPO_4 (brushite) ou $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (tricalcium phosphate).



Les deux premières réactions aboutissent à la formation de composés solubles, contrairement à la dernière équation III.24.c. La première réaction est privilégiée afin de maintenir stable le pH acide. En effet, le pKa du couple $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$ est proche de 2. La quantité de H_3PO_4 est introduite en léger excès (de l'ordre de 0,5 ml) par rapport aux conditions stœchiométriques de la première équation.

À l'issue du procédé d'extraction enzymatique, la phase soluble est neutralisée par ajout de NaOH pur (10 N). La réaction de neutralisation s'écrit de la manière suivante :



Lorsque 1 g de CaCO_3 est initialement présent dans la matière première, la quantité d'espèces minérales atteint 2,6 g après neutralisation. Pour cette quantité de CaCO_3 , seulement 0,1 ml/g de NaOH est nécessaire pour accomplir la réaction III.25. La quantité de soude ajoutée est généralement supérieure, de l'ordre de 0,4 à 0,8 ml/g. L'excès de NaOH se trouve également dans la phase liquide. La quantité des minéraux accumulés dans la phase soluble (produits par l'hydrolyse enzymatique, la neutralisation et l'excès de NaOH), est largement supérieure à la celle des minéraux résiduels dans la phase insoluble. La figure III.36 illustre d'une part l'écart d'ordre de grandeur entre les deux phases et d'autre part, la différence de comportement des quantités de minéraux au fur et à mesure de l'extraction.

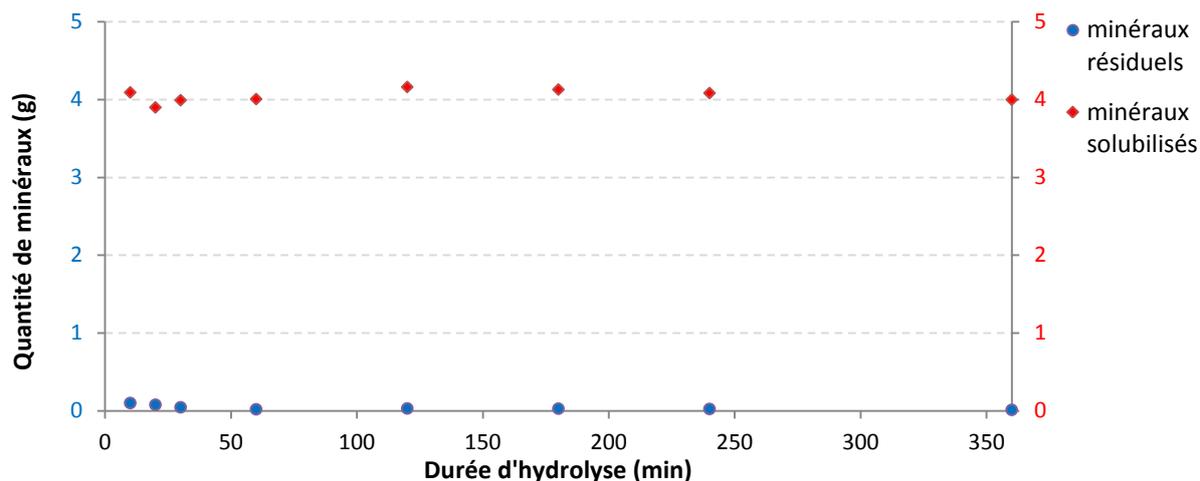


Fig.III.36 : Quantités de minéraux dans les phases solubles et insolubles au cours de la réaction

La figure III.36 montre un facteur 40 entre la quantité de minéraux dans la phase soluble et insoluble. Elle semble stable, autour de 4,1 g. Les apports en minéraux liés aux différentes réactions masquent l'évolution liée à l'hydrolyse enzymatique.

Toutefois les quantités mesurées en minéraux dans la phase soluble sont en accord avec les quantités attendues. Pour une prise d'essais de l'ordre de 5 g, soit près de 4,3 g sec, on attend 0,9 à 1,1 g de CaCO_3 à dissoudre dans la phase soluble. D'autre part, l'apport en minéraux associés à l'acidification du milieu et à la neutralisation, est estimé à près de 3,1 g, si les conditions stœchiométriques sont respectées. Enfin, l'excès de NaOH pur (10 N) s'ajoute au bilan des minéraux. Il est généralement de l'ordre de 0,8 à 1,1 g. Par conséquent, la quantité accumulée de minéraux dans la phase soluble devrait être comprise entre 3,9 et 4,2 g. Les valeurs observées corroborent celles calculées.

VII.2. Bilan massique global des protéines

Le bilan massique concernant les protéines est également étudié. La figure III.37 présente les quantités massiques de protéines dans chaque phase pour 5 g de matière première, soit 4,3 g en poids sec. Ces résultats concernent la cinétique de référence, par 25 % de pepsine à 40 °C.

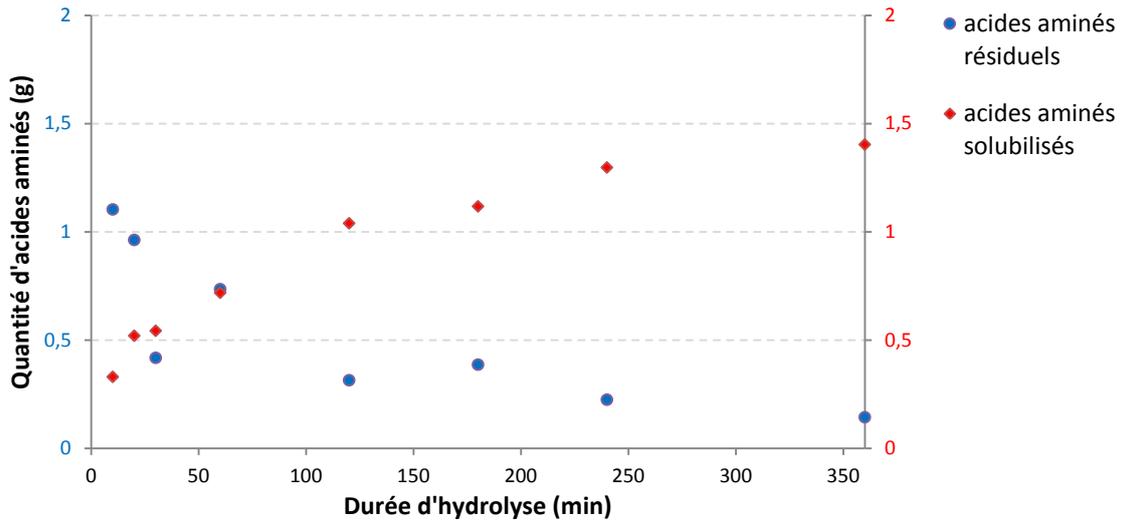


Fig.III.37 : Quantités de protéines dans les phases solubles et insolubles au cours de la réaction

La quantité de protéines dans la phase soluble, estimée par CPG, augmente avec la durée de l'extraction enzymatique de la chitine. Tandis que la quantité de protéines dans le résidu insoluble suit l'évolution inverse, elle décroît avec la durée de la réaction (Fig.III.37). La somme des deux parts protéiques est relativement constante et correspond approximativement à la quantité de protéines présentes dans la matière première. Pour la quantité de prise d'essai introduite, la quantité totale de protéines devrait être autour de 1,7 g. Les résultats observés sont proches de cette valeur.

VII.3. Bilan massique global des autres composés

Les autres composés étudiés sont les résidus glycosidiques et les lipides. Leur quantité a été mesurée uniquement dans la phase soluble du produit de 6 heures d'hydrolyse enzymatique (triplicat). Les résultats obtenus sont reportés dans la figure III.38, au côté des quantités de protéines et de minéraux. Ainsi, le bilan massique de la phase soluble peut être vérifié :

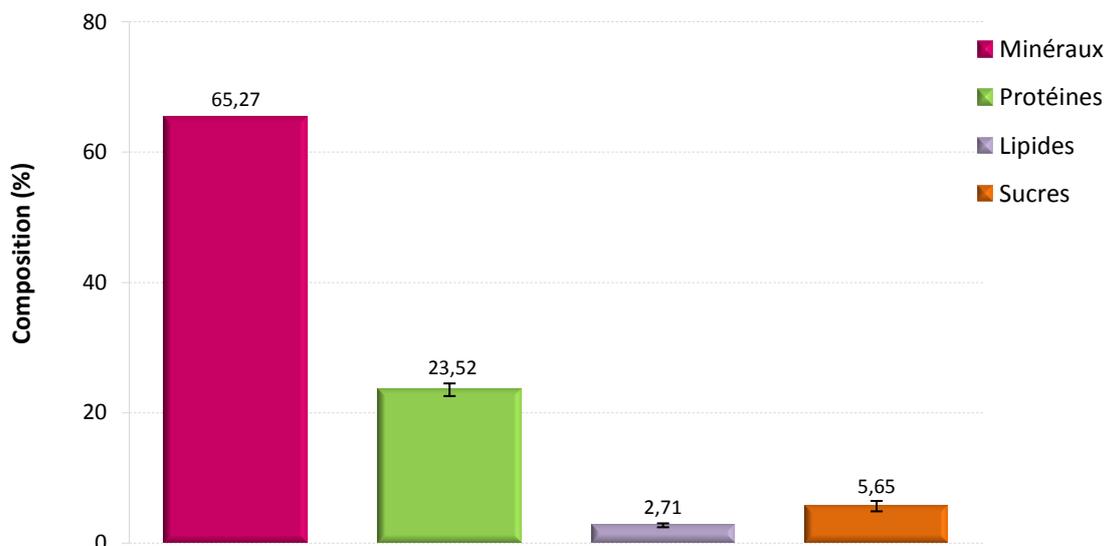


Fig.III.38 : Composition de la phase soluble après 6 h d'extraction enzymatique (cinétique de référence)

La figure III.38 montre que la part la plus importante est celle des minéraux, qui atteint 65,3 %. Suit celle des acides aminés avec $23,5 \pm 1,0$ %. La teneur en résidus glycosidiques totaux atteint $5,7 \pm 0,8$ %. La composition exacte de ces résidus a été déterminée par chromatographie et leur répartition sera discutée dans le chapitre 4 (section IV.3). La quantité totale de résidus glycosidiques serait trois fois supérieure dans la phase soluble après 6 h d'hydrolyse, par rapport à la quantité présente dans la matière première. D'autres mesures par dosage de Dubois, non illustrées ici, indiquent que cette quantité d'oses est produite dès les premières minutes de l'extraction enzymatique, puis demeure stable. Enfin, la proportion de lipides représente $2,7 \pm 0,3$ %. L'analyse détaillée de la part lipidique est également approfondie dans le chapitre 4 (section IV.4).

La somme des quantités mesurées dans la phase soluble présente un écart de près de 2,8 % avec le poids observé. Cette valeur est considérée comme incluse dans l'incertitude, ce qui signifie que le bilan sur la phase soluble est vérifié.

VIII. Extension à une autre enzyme et un autre acide

Afin d'étendre nos connaissances sur le potentiel de l'extraction enzymatique de la chitine en une seule étape, le même principe est appliqué à un nouvel acide associé à une nouvelle enzyme. Il s'agit de l'acide formique (appelé également éthanoïque), HCOOH, et l'enzyme est l'Acide Stable Protéase, nommée ASP. Elle est fournie par Bio-Cat Inc et dérive d'une enzyme extraite d'*Aspergillus niger*. Ses caractéristiques sont décrites par la figure III.39 :

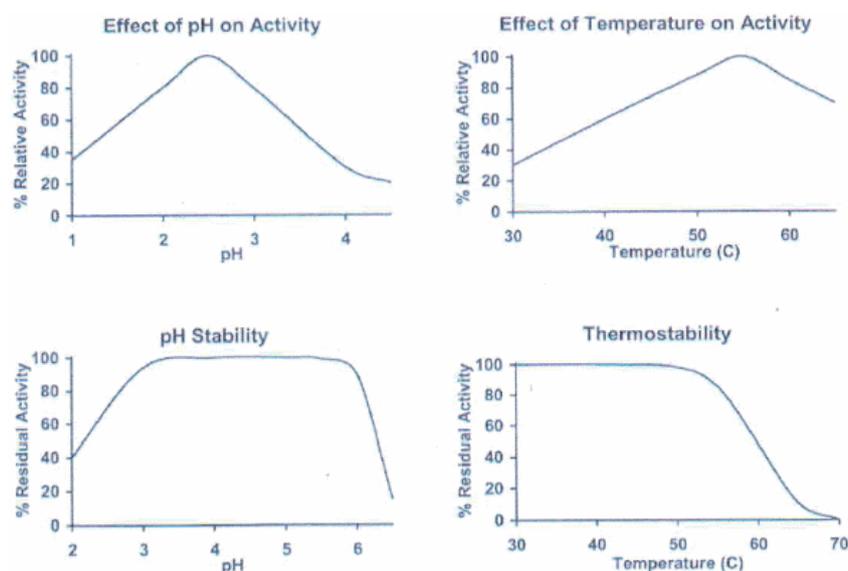


Fig.III.39 : Caractéristiques techniques de l'Acide Stable Protéase, analysées par Bio-Cat Inc

À la différence de la pepsine, l'activité de l'ASP est optimale autour de pH 3 et vers 55 °C. À ce pH, l'acidité est également importante. À 55 °C, d'après les études sur la chitosanolyse par d'autres protéases (Fig.III.6), le chitosan est dépolymérisé. La température sélectionnée pour mener l'extraction enzymatique est donc légèrement inférieure, elle est fixée à 45 °C.

Le même principe d'effet tampon entre le carbonate de calcium présent dans le substrat et l'acide est exploité pour stabiliser le pH du milieu. L'acide formique qui réagit avec le CaCO_3 est un acide faible, contrairement à l'acide phosphorique qui était un acide fort. Pour établir la quantité d'acide formique nécessaire, on utilise la formule III.27 :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{base}]/[\text{acide}] \quad (\text{III.27})$$

La formule III.27 sert à calculer la concentration d'acide formique à introduire pour obtenir le pH souhaité. En effet, le pKa de la réaction III.28 se situe autour de 3,8. Par conséquent, nous ne cherchons pas à atteindre les conditions stœchiométriques. Un pH plus acide pour favoriser la déminéralisation est recherché.



Le pH visé est de 2,7 et la concentration en « base » est assimilée à la quantité de CaCO_3 dans la matière première. La mise en œuvre de l'extraction enzymatique est identique au protocole antérieur. Pour la même prise d'essai de 5 g, la concentration en HCOOH est de 2,7 M (pour rappel, elle était de 0,9 M pour l'acide phosphorique).

L'effet de l'acide seul, sans incorporation d'enzyme, est d'abord évalué et comparé à celui de l'acide phosphorique, de 7 à 360 min (Fig.III.40. a, b et c).

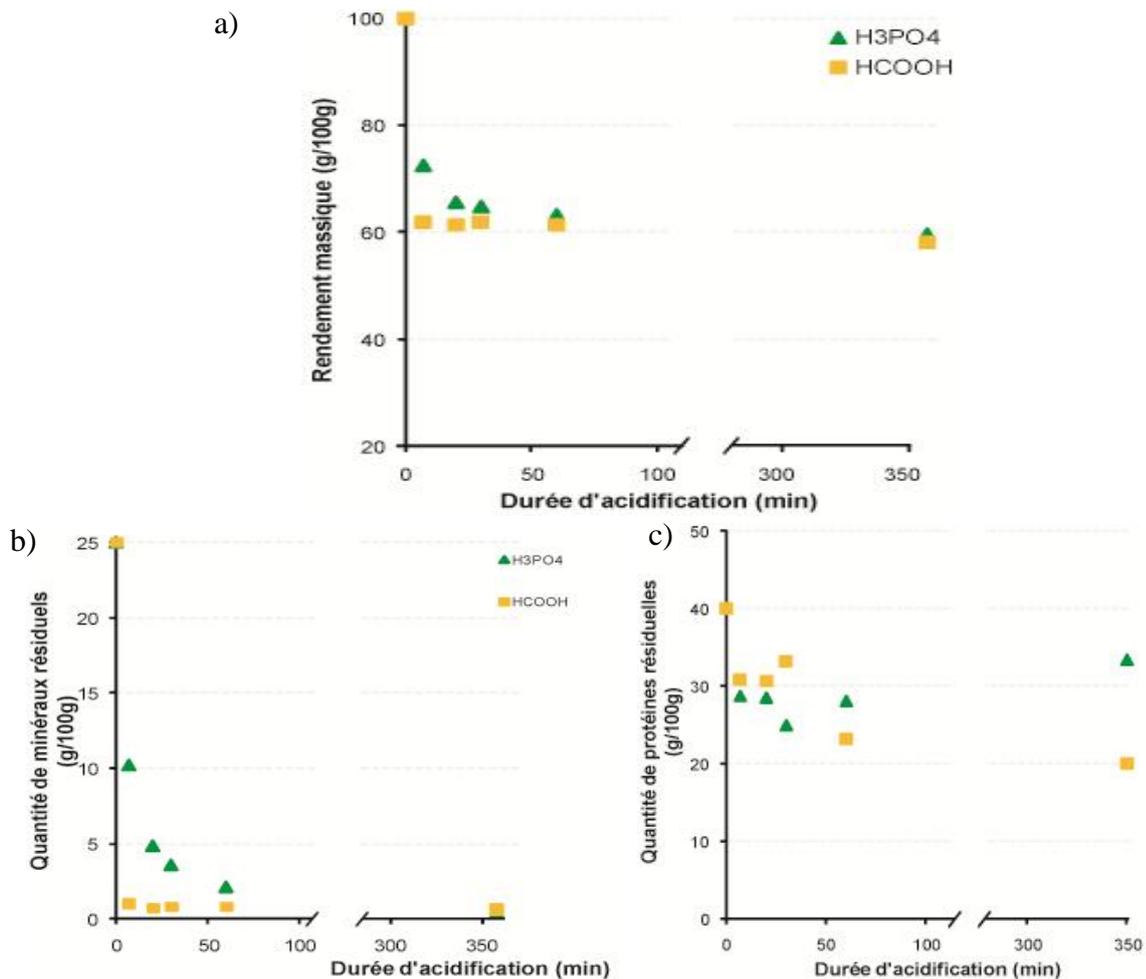


Fig.III.40 : Comparaison du rendement massique (a), de la quantité de minéraux résiduels (b) et des protéines résiduelles (c) en fonction de l'acide employé

La masse finale après traitement par l'acide formique est similaire à celle obtenue par le traitement à l'acide phosphorique, 58,2 et 59,5 g/100 g de matière première respectivement. Cependant les cinétiques observées sont différentes.

Pour l'acide formique, la vitesse de perte de masse est plus rapide. À 7 min d'acidification, la masse éliminée par le H_3PO_4 est de 27,6 % tandis que le $HCOOH$ élimine 38,2 % de la matière. Cette différence est due à l'élimination des minéraux d'après la figure III.40.b. À 7 min d'acidification, les quantités résiduelles de minéraux sont de 10,2 et 1,0 g/100 g respectivement par H_3PO_4 et $HCOOH$. Pour 360 min d'hydrolyse, les valeurs observées sont proches (0,5 et 0,6 g/100 g respectivement). Au contraire les pertes de protéines, déterminées également par CPG, présentent des cinétiques similaires. À 7 min d'acidification, les produits contiennent respectivement 28,7 g/100 g et 30,7 g/100 g. Cependant, le traitement par l'acide formique semble favoriser davantage la déprotéinisation (≈ 20 g/100 g de protéines résiduelles) contrairement à l'acide phosphorique qui semble stabiliser la quantité de protéines autour de 28 g/100 g.

Les meilleurs résultats offerts par l'acide formique sont probablement liés à sa forte concentration. En effet, elle est trois fois supérieure à la concentration en acide phosphorique (2,7 M contre 0,9 M). La composition des produits à 7 min sert de point de départ pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse ($t = 0$).

Les rendements massiques et les compositions des produits issus de la cinétique d'hydrolyse enzymatique, par 25 % d'ASP en milieu maintenu acide par $HCOOH$, sont illustrés par la figure III.41. La réaction a été appliquée aux fragments de matière première < 1 mm, à 45 °C, à pH 2,7 :

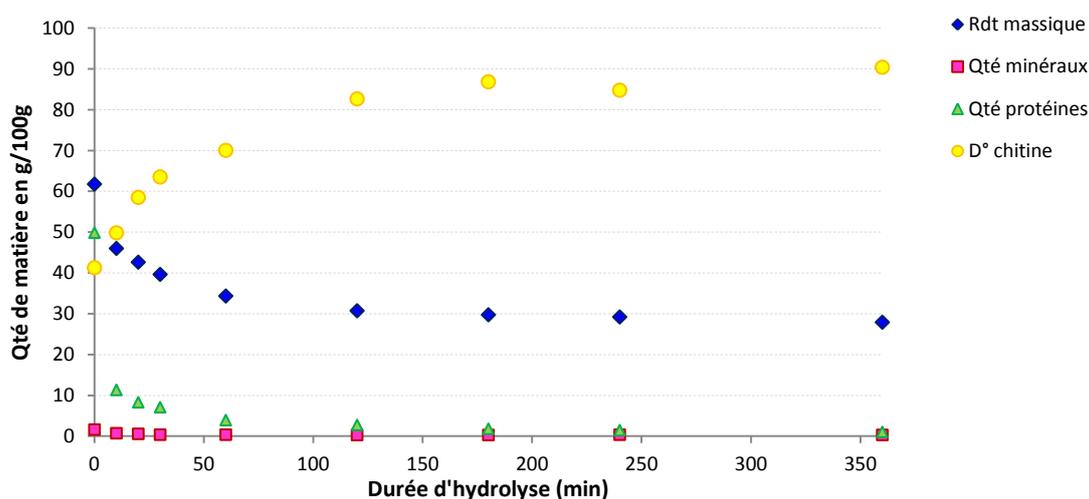


Fig.III.41 : Composition des résidus solides de l'hydrolyse par 25 % d'ASP à 45 °C, pH 2,7

Le rendement massique décroît en deux heures de 61,8 à 30,7 g/100 g. Puis la perte de matière devient extrêmement lente, jusqu'à atteindre 27,0 g/100 g après 360 min d'hydrolyse. La déminéralisation est extrêmement rapide, dès 10 min d'extraction, la quantité résiduelle de minéraux est inférieure à 1 g/100 g. La cinétique de déprotéinisation est plus lente et limite

donc celle du rendement massique. La quantité résiduelles de protéines est de 1,0 g/100 g après 360 min d'extraction enzymatique. Par le lavage chimique à la soude, l'estimation du degré de pureté montre une augmentation au fur et à mesure de l'extraction, pour atteindre 90,4 % à 360 min. La figure III.42 compare cette composition à celle obtenue par son hydrolyse homologue, par 25 % de pepsine. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

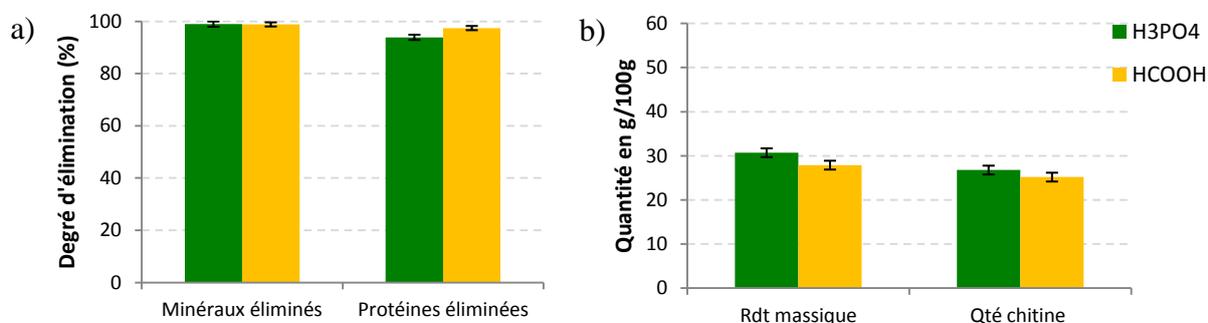


Fig.III.42 : Comparaison des performances d'extraction enzymatique selon l'acide employé, de part les degrés de déminéralisation et de déprotéinisation (a), le rendement massique et la quantité de chitine (b), $n=3$

La figure III.42.a montre que la déminéralisation n'est pas significativement différente par l'acide phosphorique et l'acide formique, après 6 h d'extraction enzymatique, elle atteint respectivement $98,9 \pm 0,3$ % et $98,8 \pm 0,3$ %. La déprotéinisation aboutit à une meilleure performance par le HCOOH avec $97,4 \pm 0,5$ % des protéines soutirées de la phase insolubles, contre $93,9 \pm 0,8$ % par le H₃PO₄. On constate également une différence de rendement massique en fonction de l'acide employé. Elle peut s'expliquer par la différence de degré de déprotéinisation et par une éventuelle perte de chitine. Selon la figure III.42.b, la quantité de chitine dans le produit de 6 h, estimée par le lavage chimique, est légèrement inférieure par l'acide formique, avec $25,2 \pm 0,2$ g/100 g, contre $26,8 \pm 0,2$ g/100 g par l'action de l'acide phosphorique. Pour approfondir l'étude de l'impact de l'acide formique, l'extraction est prolongée jusqu'à 12 heures (Tab.III.14).

Produits D'hydrolyse	Rdt massique		Minéraux		Protéines			Degré de pureté			
	%	σ	(g)	σ	% éliminé	(g)	Σ	% éliminé	Bilan	NaOH	Σ
pep25% - H ₃ PO ₄ - 6 h	30,7	$\pm 0,4$	0,3	$\pm 0,3$	98,9	3,3	$\pm 0,8$	91,7	88,0 %	87,2 %	$\pm 1,5$
pep25% - H ₃ PO ₄ - 12 h	26,4	$\pm 0,5$	0,4	$\pm 0,3$	98,5	1,0	$\pm 0,1$	95,0	94,5 %	88,1 %	$\pm 2,0$
ASP25% HCOOH - 6 h	27,9	$\pm 0,7$	0,3	$\pm 0,1$	98,8	1,0	$\pm 0,5$	97,4	95,2 %	90,4 %	$\pm 1,2$
ASP25% HCOOH - 12 h	27,3	$\pm 0,9$	0,2	$\pm 0,0$	99,3	0,9	$\pm 0,1$	97,7	95,2 %	91,7 %	$\pm 1,9$

Tab.III.14 : Comparaison des caractéristiques des produits insolubles obtenus par hydrolyse enzymatique, par la pepsine et par l'ASP, après 6 h et 12 h de réaction

La différence de rendement massique entre l'action de H₃PO₄ et HCOOH est rattrapée lorsque la durée de l'hydrolyse est poursuivie 12 h. Le rendement massique à 12 h, par le H₃PO₄, avec 26,4 g/100 g, demeure inférieur à celui obtenu par le HCOOH, qui atteint 27,3 g/100 g.

La déminéralisation n'est pas améliorée par l'augmentation de la durée d'hydrolyse de 6 h à 12 h lorsque l'acide phosphorique est utilisé. En revanche avec l'acide formique,

l'augmentation de la durée de protéolyse acide semble améliorer légèrement le degré de déminéralisation, qui atteint 99,3 % à 12 h.

La déprotéinisation par la pepsine est améliorée par le prolongement de la protéolyse acide. Elle augmente de 91,7 à 95,0 % lorsque la durée est allongée de 6 h à 12 h. La déprotéinisation par l'ASP avec l'acide formique se maintient autour de 97,4 % au-delà de 6 h de protéolyse acide. De plus, ses performances demeurent plus intéressantes par rapport à l'emploi de la pepsine avec l'acide phosphorique.

L'estimation du degré de pureté par au lavage chimique, ne semble pas être amélioré significativement par l'augmentation de la durée d'hydrolyse à 12 h. Par ailleurs, le tableau III.14 permet de comparer cette méthode à celle du bilan de masse. Le résultat est systématiquement inférieur par la méthode de nettoyage chimique par le NaOH. Ceci indiquerait que cette méthode est trop drastique pour ces produits et entraînerait une partie de la chitine. Quelle que soit la méthode, le degré de pureté est amélioré par l'emploi de l'acide formique et d'ASP, pour un même temps d'hydrolyse.

Pour conclure, l'utilisation de l'acide formique avec l'ASP est avantageuse par rapport à l'acide phosphorique avec la pepsine lorsque la protéolyse acide dure 6 h. Le rendement massique, la déprotéinisation et le degré de pureté sont améliorés. Cet avantage s'amenuise lorsque la durée d'hydrolyse se poursuit jusqu'à 12 h. Par ailleurs, au regard de la cinétique, l'utilisation de l'acide formique se révèle intéressante pour réduire davantage la durée du procédé.

IX. Conclusions du chapitre 3

L'objectif de ce chapitre était d'étudier les paramètres susceptibles d'influencer les cinétiques de purification de la chitine. L'effet du milieu acide a d'abord été suivi seul, en guise d'expérience témoin. Les fragments d'exosquelette de crevettes de taille intermédiaire ont été immergés dans l'acide phosphorique (H_3PO_4) pendant 6 h, sous agitation à 40°C. Puis, pour mener la déprotéinisation, la pepsine a été ajoutée. L'influence de sa concentration, ainsi que celle de la température et de la taille initiale des fragments de matière première, ont été étudiés dans le cadre d'un plan d'expérience.

Les résultats ont mis en évidence le rôle de l'acide phosphorique seul sur la déminéralisation, avec 98,1 % des minéraux éliminés après 6 h, et très faiblement sur la déprotéinisation, avec 28,2 % des protéines éliminées dès les premières minutes. L'ajout de pepsine améliore plus ou moins la déminéralisation tandis que la déprotéinisation est nettement améliorée. Les meilleures performances du plan d'expérience sont obtenues lorsque les tailles des fragments de matière première sont les plus réduites et que la concentration en enzyme est la plus élevée (Tab.III.15). Toutefois, les écarts mesurés suite à la répétition des conditions intermédiaires sont importants et une analyse plus approfondie a été menée.

L'analyse statistique a confirmé le rôle prédominant de la taille des fragments de matière première sur la déminéralisation et la déprotéinisation. D'après Marquis-Duval (2008), une réduction inférieure à 1 mm n'entraîne plus de modification notable de la cinétique de déminéralisation. Cependant, l'expérience pourrait être menée pour estimer son impact sur la cinétique de déprotéinisation. De plus, une analyse de la morphologie et de la surface de contact des fragments nous conduirait à une meilleure maîtrise de l'accessibilité des sites à hydrolyser aux protéases.

Par rapport à ce facteur taille, l'influence de la concentration en pepsine sur la déprotéinisation et celle de la température sur la déminéralisation sont moindres. Ces résultats montrent la difficulté à déprotéiniser complètement la chitine. Le domaine d'étude a été étendu pour améliorer les performances de déprotéinisation (Tab.III.15).

	Plan d'exp (intermédiaire)	Plan d'exp (15%; <1mm)	Hors plan d'exp (40°C; 25%; <1mm)	Hors plan d'exp (40°C; 41%; <1mm)
Rdt massique	37,9 ± 1,5 %	32,9 - 33,5%	30,7 %	28,0 %
Déminéralisation	97,2 ± 1,8 %	99,5 - 98,5 %	98,9 %	99,3 %
Déprotéinisation	85,5 ± 3,3 %	86,3 - 92,4 %	91,7 %	92,8 %
Degré de pureté (NaOH)	68,9 ± 2 %	76,5 - 83,9 %	87,2%	93,1 %
Rapport C/N	5,1 ± 0,3	5,8 - 5,9	5,7	6,2

Tab.III.15: Récapitulatifs des performances atteintes après 6 h de protéolyse acide

L'augmentation de la concentration en pepsine permet d'éliminer davantage les impuretés liées à la chitine. Cependant, la quantité de pepsine ajoutée au-delà de 25 % devient très importante par rapport à la faible amélioration des performances. La durée d'hydrolyse a également été allongée jusqu'à 12 h. Le degré de pureté en chitine est alors estimé via le

lavage au NaOH à $88,1 \pm 2,0$ % et le rendement massique est de 26,4 g/100 g. La pureté en chitine est donc faiblement améliorée par rapport à l'hydrolyse de 6 h, tandis que la perte de matière est plus importante. Les protéines semblent être davantage éliminées, d'après le degré de déprotéinisation qui est de l'ordre de 95 %.

À partir de l'ensemble des données, un travail de modélisation a été entrepris pour affiner les tendances indiquées par les précédents résultats. La démarche a consisté à construire des modèles à partir de nos connaissances et à les confronter aux résultats réellement mesurés.

Le modèle retenu pour la déminéralisation est une addition de structures polynomiales associée à chaque facteur, multipliée par la quantité de minéraux et par une fonction linéaire associée aux mêmes minéraux :

$$\frac{dM}{dt} = 0.05 \times (1 + 4.53M) \times (1 - 1.65 \times Ta - 0.89 \times Ta^2 + 0.19 \times T^\circ + 1.33 \times T^{\circ 2} - 0.02 \times [pep] + 0.68 \times [pep]^2) \times M \quad (\text{III.18})$$

Le modèle retenu pour la déprotéinisation est divisé en deux compartiments. Chacun comprend une fonction de type Monod associé à la concentration en pepsine. L'influence de la taille des fragments de matière première est formalisée par une fonction polynomiale du 2^{ème} ordre dans le premier compartiment et du 1^{er} ordre dans le second. Enfin, une fonction allostérique intervient dans le premier compartiment. Elle traduit une opposition à la déprotéinisation à mesure que la durée de protéolyse acide s'écoule :

$$\left. \begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} &= [-12.96 + 0.50 \times Ta - 6.54 \times Ta^2] \times \frac{[Pep]}{[Pep] + 9} \times \frac{P_1^{2.1}}{P_1^{2.1} + 5.88^{2.1}} \times P_1 \\ \frac{dP_2}{dt} &= [-20.74 + 19.68 \times Ta] \times \frac{[Pep]}{[Pep] + 2} \times P_2 \end{aligned} \right\} \quad (\text{III.22})$$

$P_1(0) = 21.28$, $P_2(0) = 11.01$, donc $P(0) = 32.29$

À partir de ces modèles et en tenant compte des contraintes économiques du procédé, un outil a été développé pour déterminer ses conditions optimales. Elles consistent à trouver un équilibre entre la purification maximale de la chitine et le coût minimal de sa production.

$$J = \frac{D}{C} = \frac{f_b[(f_{\text{dém}} + f_{\text{déprot}}) \times f_{\text{dt}}]}{f_c[f_{\text{durée}} + f_{\text{enz}} + f_{\text{Ta}} + \text{autres}]} \quad (\text{III.23})$$

Les conditions retenues pour la suite de cette étude correspondent donc à l'hydrolyse conduite par 25 % de pepsine à 40°C à partir de taille de fragment inférieurs à 1 mm. La phase liquide récupérée après 6 h d'hydrolyse contient 65,3 % de minéraux, 23,5% de protéines, 2,7 % de lipides et 5,7 % de sucres.

Devant la difficulté à déprotéiniser, une nouvelle enzyme a été testée, l'Acide Stable Protéase. Un autre acide a été employé pour obtenir également un pouvoir tampon proche du pH d'activité optimale de l'ASP. Il s'agit de l'acide formique. L'effet de l'acide seul aboutit à des cinétiques de déminéralisation et déprotéinisation plus rapides. La protéolyse acide de 6 h permet d'atteindre un degré de pureté en chitine de 90,4 % d'après le lavage au NaOH et un degré de déminéralisation de 98,8 %. Ces performances sont proches de celles obtenues par la

pepsine à la même concentration. En revanche, la déprotéinisation semble être améliorée, elle atteint 97,4 %. En allongeant la durée de protéolyse acide à 12 h, le degré de déprotéinisation demeure du même ordre de grandeur.

Chapitre 4 – Comparaison entre l'hydrolyse enzymatique acide et les autres voies d'extraction

I. Performances de déminéralisation et de déprotéinisation

I.1. Comparaison avec l'extraction chimique

L'hydrolyse enzymatique est comparée à l'extraction chimique, selon le protocole détaillé au chapitre 2 II.1, en guise de référence. Pour rappel, il s'agit d'une heure de déminéralisation par HCl 1 N à température ambiante, suivie de deux heures de déprotéinisation par NaOH 1,25 N à 90 °C. D'autre part, les caractéristiques de la composition de la chitine commerciale étaient décrites par le tableau II.8. Par exemple, les teneurs en minéraux et en protéines atteignent respectivement 0,5 % et 0,3 % pour le produit de haut degré de pureté fourni par Sigma, et 4,2 % et 0,9 % pour le produit fourni par Mahtani.

Le produit de la déminéralisation chimique (par traitement au HCl) est caractérisé par une teneur en minéraux résiduels de 0,4 %, puis de 25,3 % et 32,3 % de protéines et chitine respectivement. Le produit de la déprotéinisation chimique (par traitement au NaOH) se caractérise par une faible teneur en protéines résiduelles, 0,5 %, puis 26 % et 31,6 % de minéraux et chitine respectivement (Fig.IV.1).

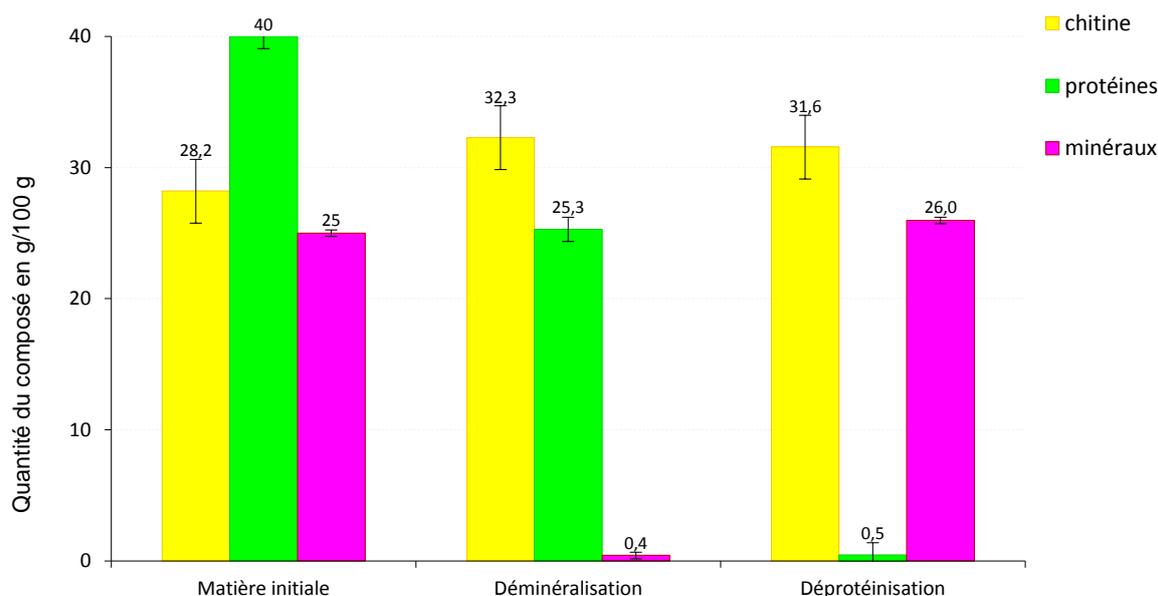


Fig.IV.1 : Conséquence de la déminéralisation et déprotéinisation chimique sur la composition des produits

La figure IV.1 exprime les quantités des principaux composés (chitine, protéines et minéraux) déterminées suite à l'application de chacune des deux étapes de l'extraction chimique, réalisées indépendamment. Le traitement acide seul, par HCl 1 M à température ambiante, déminéralise $98,5 \pm 0,1$ % des minéraux initialement présents. À cette étape, $36,8 \pm 4,3$ % des protéines sont également éliminées. Le traitement alcalin chimique seul, par NaOH 1,25 M à 90 °C, est responsable de la perte de $98,8 \pm 0,3$ % des protéines et $8,9 \pm 1,6$ % des minéraux. La composition finale, suite aux deux étapes successives, se caractérise par des degrés de déminéralisation et de déprotéinisation de $99,6 \pm 0,1$ % et $99,5 \pm 0,4$ % respectivement.

I.1.1. Degré de déminéralisation

La comparaison des performances de déminéralisation entre les différentes hydrolyses enzymatiques et l'extraction chimique est illustrée par la figure IV.2 :

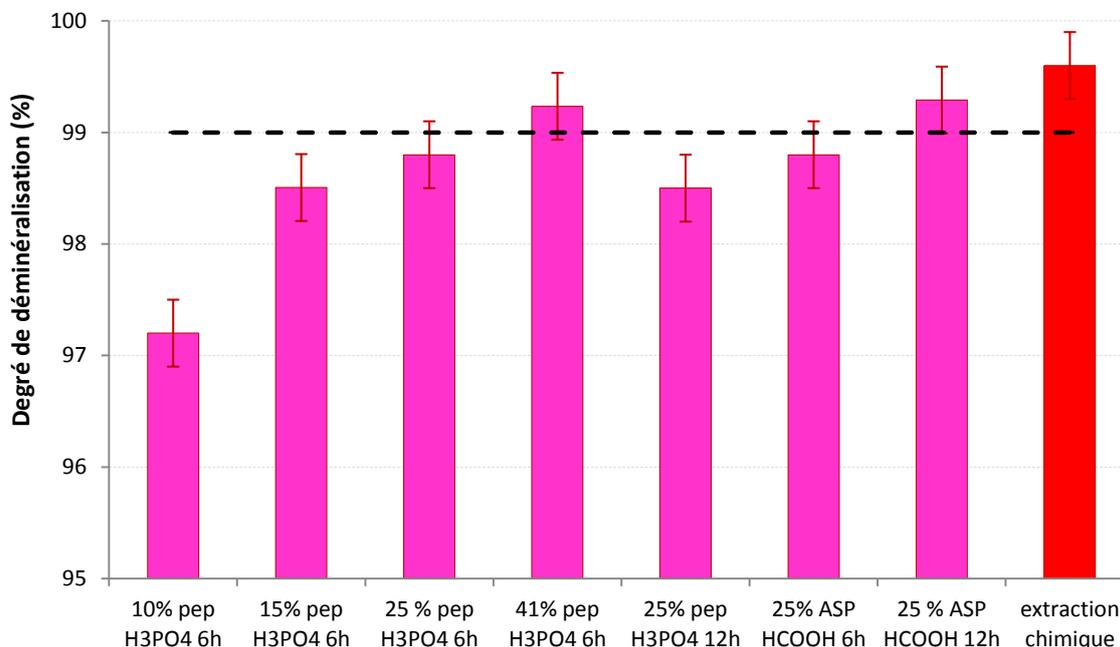


Fig.IV.2 : Comparaison des degrés de déminéralisation en fonction des procédés d'extraction

La figure IV.2 montre que toutes les conditions d'hydrolyse permettent d'atteindre un degré de déminéralisation élevé. La déminéralisation la plus faible est observée avec l'hydrolyse enzymatique de 6 h par 10 % de pepsine, dont le degré de déminéralisation est de 97,2 %. À l'inverse, l'extraction chimique présente le meilleur degré de déminéralisation, avec 99,6 %. Cette performance constitue un objectif pour nos procédés, cependant une tolérance peut être accordée. Au regard de la littérature et de cahiers des charges de chitine commerciale, le seuil est de 1 % de minéraux résiduels. Pour nos produits, cette quantité correspond à un degré de déminéralisation de $99,0 \pm 0,2$ %.

Compte tenue des incertitudes, presque toutes les hydrolyses remplissent cet objectif, exception faites des extractions par 10 % et 15 % de pepsine. L'hydrolyse de 12 h par 25 % de pepsine affiche également une faible déminéralisation, 98,3 %, par rapport aux autres hydrolyses, notamment par rapport à son homologue de 6 h. Ceci semble contradictoire et montre que la comparaison entre ces performances est limitée par les incertitudes de mesures et les faibles écarts entre les hydrolyses.

Le tableau IV.2 souligne également le potentiel de l'hydrolyse par l'ASP en acide formique. Les degrés de déminéralisation atteignent 98,8 % et 99,3 %, après 6 h et 12 h d'extraction enzymatique respectivement. L'expérience de l'hydrolyse par la pepsine en acide formique a également été menée. Cependant, les résultats (non décrits ici) se sont révélés moins intéressants.

I.1.2. Degré de déprotéinisation

La même démarche est appliquée pour comparer les degrés de déprotéinisation des produits de référence (Fig.IV.3) :

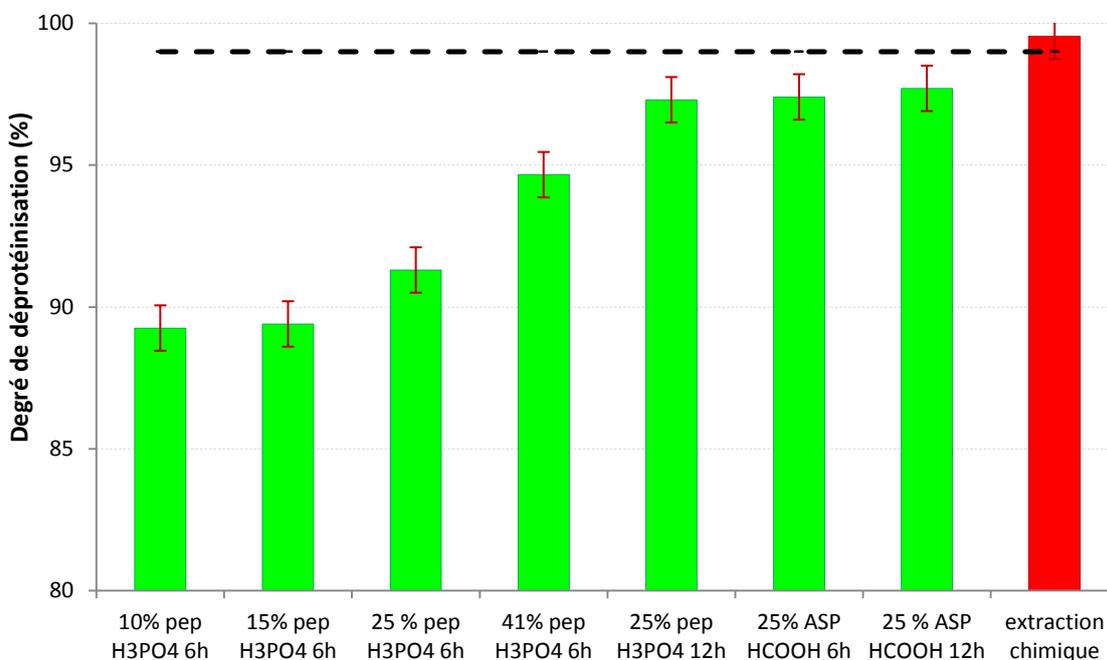


Fig.IV.3 : Comparaison des degrés de déprotéinisation en fonction du procédé d'extraction

La figure IV.3 présente des degrés de déprotéinisation compris entre 89,3 et 97,7 % lorsque l'extraction de la chitine est menée par voie enzymatique. Tandis que l'extraction chimique aboutie à 99,5 % de protéines éliminées. Contrairement à la déminéralisation, le seuil de 99 % n'est atteint par aucune hydrolyse enzymatique.

Comme les modèles précédemment établis le soulignaient, la déprotéinisation est favorisée par l'augmentation de la concentration en enzyme. La figure IV.3 illustre ce phénomène avec une évolution du degré de déprotéinisation de 89,3 à 94,7 lorsque la concentration en pepsine varie de 10 à 41 %.

Les degrés de déprotéinisation de trois hydrolyses se détachent nettement des autres. Il s'agit de l'hydrolyse de 12 h par 25 % de pepsine et les deux hydrolyses par l'ASP. Elles ne présentent pas de différences significatives entre elles et offrent les meilleures performances de déprotéinisation, supérieures à 97 %. Néanmoins, les contraintes de coûts invitent à éviter les longues durées de production (Chapitre 3.VI). En effet, le doublement de la durée d'hydrolyse double également la consommation énergétique. Par conséquent, l'hydrolyse de 6 h par l'ASP est la plus intéressante et la plus proche des performances de l'extraction chimique.

L'acide formique est également autorisé comme additif alimentaire. Il est nommé E 236 dans

la nomenclature européenne. Comme pour l'acide phosphorique, le contact avec une matrice alimentaire est autorisé. Par exemple, des fournisseurs chinois et indiens proposent de l'acide phosphorique et formique à des prix de l'ordre de 850 à 1000 USD/tonnes et de 100 à 800 USD/tonnes respectivement (Source Web, comparaison de plusieurs fournisseurs).

Pour les hydrolyses de 12 h par 25 % de pepsine et de 6 h et 12 h par l'ASP, la quantité de protéines résiduelles est inférieure à 6 %. Bien que cette quantité soit au-dessus des seuils généralement fixés pour commercialiser la chitine, elle est relativement faible. De plus, le chitosan et la glucosamine sont davantage commercialisés que la chitine. Or ils subissent d'autres réactions, au cours desquelles il est possible d'abaisser encore la charge protéique.

1.2. Comparaison avec d'autres procédés d'extraction biologique

La section précédente met en évidence des performances médiocres en déprotéinisation de l'hydrolyse enzymatique par la pepsine par rapport à l'extraction chimique. Qu'en est-il vis-à-vis des performances obtenues par des procédés biologiques similaires ? Parmi ces procédés, on distingue l'ensilage, de la fermentation et de l'hydrolyse enzymatique directe. L'ensilage est un mode de fermentation naturel. Les conditions de pH et de température y sont libres, contrairement aux autres fermentations dont les paramètres sont davantage contrôlés. Le chapitre 1.VI décrit des exemples de fermentation, lesquels vont être comparés aux résultats de cette étude.

Nous avons regroupé différentes performances d'extractions biologiques dans le tableau IV.11. Elles sont principalement extraites de l'étude de Xu et al. (2008) et complétées par des études postérieures. Quand ils sont connus, leur degré de déminéralisation, de déprotéinisation et la durée du traitement sont comparés. De surcroît, le tableau classe les procédés en fonction du type et du nombre d'étape. En effet, la plupart des procédés biologiques sont complétés par un traitement chimique afin de purifier la chitine. Or, le nombre d'étapes impacte directement le rendement de production.

Source	Réactifs, enzyme, microorganismes	Degré d'élimination		Durée	Littérature
		Déprotéinisation	Déminéralisation		
ENSILAGE					
<i>Nephrops norvegicus</i> déminéralisé	Stabsil®, <i>S. faecium</i> M74 <i>P. acidilactici</i> , ...	40 %	/	7 jours	Healy et al (1994)
<i>Penaeus sp.</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> B2	85 %	87,6 %	6 jours	Cira et al (2002)
FERMENTATION					
Shrimp	<i>Lactocobacillus plantarum</i> 541	75 %	86 %	/	Rao et al. (2000)
<i>Procambarus clarkii</i> (langouste prétraitée)	<i>Lactobacillus paracasei</i> A3	94 %	97,2 %	3 jours	Cremades et al. (2001)
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i> 4023 immobilisés	81,5 %	91,2%	2,1 jours	Bautista et al. (2003)
<i>Nephrops norvegicus</i>	Sil-Al x 4 ^{TMA} , <i>S. faecium</i> M74, <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>P. acidolactici</i>	/	93,8 %	7 jours	Healy et al. (2003)

I. Performances de déminéralisation et de déprotéinisation

Chionoecetes japonicus	<i>L. paracasei</i> sp. <i>tolerans</i> KCTC-3074	52,6 %	97,2 %	7 jours	Jung et al. (2006)
Penaeus monodon	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,1 %	98,9 %	2 jours	Waldeck et al. (2006)
Penaeus monodon	<i>P. acidolactici</i> CFR2182	97,9 %	72,5 %	3 jours	Bhaskar et al. (2006)
Metapenaropsis dobsoni	<i>Bacillus subtilis</i>	84 %	72 %	15 jours	Sini et al. (2007)
Chionoecetes japonicus	<i>L. paracasei</i> sp. <i>tolerans</i> KCTC-3074, <i>Serratia marscens</i> FS-3	68,9 %	94,3 %	12 jours	Jung et al. (2007)
Penaeus monodon	Enrichissement culture GM, <i>L. casei</i> MRS1	97,4 %	99,6 %	4,8 jours	Xu et al. (2008)
Crangon crangon prêtâté	Enrichissement culture GM, <i>L. casei</i> MRS1	90,8 %	99,7 %	4 jours	Xu et al. (2008)
Penaeus vannamei	<i>Bactéries lactiques</i>	91 %	94 %	6 jours	Pacheco et al. (2009)
PROTEOLYSE + chimie					
Penaeus vannamei	<i>Papaine</i>	/	/	/	Gartner (2010)

Tab.IV.1 : Comparaison des performances d'extraction de la chitine par voies biologiques, Xu et al. 2008

Les meilleurs degrés de déminéralisation et déprotéinisation cités par Xu et al (2008) sont ceux obtenus par Waldeck et al. (2006). Cette extraction est le fruit d'une fermentation de deux jours, par des bactéries extraites de coproduits de crevettes et sélectionnées pour leur activité protéolytique. Le degré de déprotéinisation atteindrait 98,1 %, mesuré par le dosage de Lowry. Puis, suite à une étape complémentaire d'acidification, par l'ajout d'acide lactique à 0,9 %, le degré de déminéralisation atteindrait 98,9 % après 3 h. Cependant, à la lecture de la dite référence, ces valeurs semblent correspondre à un autre mode opératoire. De plus, le degré de pureté en chitine, estimé via la teneur en nitrogène, est de 87 %, par conséquent les bilans massiques de ces expériences ne semblent pas vérifiés (Waldeck et al. 2006).

La fermentation lactique expérimentée par Bhaskar et al. (2006) est efficace sur le plan de la déprotéinisation, avec 97,9 % de protéines éliminées. Cependant, la déminéralisation, aidée par aucun complément acide, ne dépasse pas 72,5 % de minéraux éliminés. Les meilleures performances semblent être celles obtenues par Xu et al (2008), dont le principe est basé sur une fermentation anaérobie suivie d'une fermentation lactique. Le degré de déminéralisation atteint son plus haut niveau lorsque le pH descend au plus bas. Par exemple, 80 % du calcium est dissout lorsque le pH diminue jusqu'à 3,9, avant la seconde étape de fermentation. Les teneurs en protéines sont mesurées par la méthode de Kjeldahl, après soustraction de l'azote théorique associé à la chitine. Ce résultat est ensuite confirmé par comparaison avec le dosage de Bradford (Cf. chapitre 2). La quantité de chitine est également déterminée par purification chimique. Les degrés de déminéralisation et de déprotéinisation atteignent jusqu'à 99,6 % et 97,4 % respectivement. La durée du procédé est inférieure à 5 jours, ce qui place ce traitement d'extraction biologique parmi les plus courts. De plus, le degré de pureté en chitine obtenu est de l'ordre de 94 %, ce qui constitue la meilleure performance de degré de pureté parmi les procédés biologiques d'extraction de chitine.

Au regard des variations des quantités de protéines mesurées en fonction de l'analyse employée, la comparaison des degrés de déprotéinisation est une démarche délicate et doit rester prudente. La comparaison des degrés de déminéralisation repose sur des données plus solides. Cette opération atteint facilement le seuil de 99 % dès lors où l'étape d'acidification est menée, soit en même temps que la déprotéinisation, soit en complément. Parmi les procédés en une seule étape, l'action des bactéries lactiques permet d'atteindre des degrés de déminéralisation élevés grâce à la production d'acide lactique. Cependant, elles atteignent ces performances avec des durées de fermentation supérieures à 48 h, tandis que le procédé de protéolyse acide offre la même performance de déminéralisation en 6 h seulement. La durée du procédé peut être liée au coût de production quand elle nécessite un apport énergétique. Ainsi, une réduction du temps de traitement peut constituer un avantage industriel. De même pour la déprotéinisation, notre procédé atteint une élimination de 94 % à 97 % des protéines en 6 h à 12 h de traitement tandis que cette performance s'acquiert en plusieurs jours par les procédés biologiques comparables, d'après le tableau IV.1.

Par ailleurs, l'introduction directe d'enzyme pour conduire l'extraction enzymatique constitue un avantage technique par rapport à la mise en œuvre de microorganismes. Comme tout matériel vivant, leurs conditions optimales de croissance et d'activité sont sensibles à de nombreux paramètres (T° , pH, sels et apports nutritifs, etc.). À l'inverse, le contrôle des enzymes exogènes est plus aisé à maîtriser. Le risque de présence d'enzymes endogènes, pour notre étude, est fortement réduit par les étapes de préparation de la matière première. En revanche, la durée du procédé développé dans cette étude est supérieure à celle de l'extraction chimique. Ceci pourrait se révéler être un avantage dans le cas où la production de chitine doit être adaptée en cours de traitement, pour répondre à un cahier des charges précis. En effet, le suivi de la production par des indicateurs, tel que le pH, permet d'adapter les paramètres de procédé, afin d'atteindre les caractéristiques du produit fini visées.

II. Qualité physico-chimique des produits

II.1. Degré d'acétylation

Le degré d'acétylation est l'une des principales caractéristiques qui détermine le type d'application destiné aux dérivés de chitine (Aranaz, 2010 ; Annexe B). Les DA des principaux produits d'extraction enzymatique sont mesurés par RMN ^1H et comparés dans la figure IV.4 :

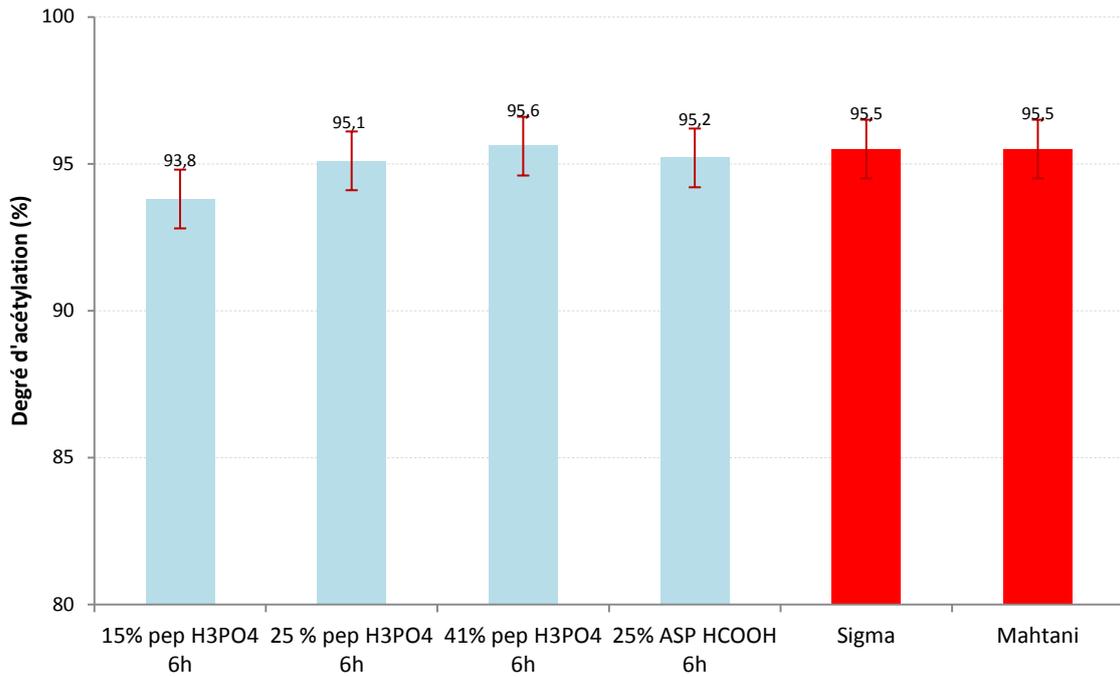


Fig.IV.4 : Degré d'acétylation des principales chitines produites par voie enzymatique et chimique

Comme l'explique le chapitre 2 IV.5, la RMN ^1H s'effectue sur des produits sans protéines, pour éviter qu'elles n'interfèrent sur la mesure de DA. C'est la raison pour laquelle le DA de la matière première n'est pas présenté. La plupart des études l'estime supérieur à 95 % dans les coproduits de crustacés (Aranaz, 2010).

Les degrés d'acétylation des produits d'extraction enzymatique ne sont pas significativement différents entre eux, ni différents des chitines commerciales. Les DA sont de l'ordre de 95 %, sauf pour l'hydrolyse par 15 % de pepsine. Elle présente un degré d'acétylation inférieur, soit 93,8 %. Les conditions du procédé sont pourtant plus douces. On peut alors supposer que ce résultat est le fruit d'une interférence avec des protéines résiduelles ou à l'inverse d'un nettoyage chimique trop drastique.

Au regard de ces résultats, les DA de la chitine d'extraction chimique comme enzymatique ne présentent pas de différences significatives. Ceci permet de conclure que les deux procédés ont le même impact sur le degré d'acétylation de la chitine.

Rares sont les études qui analysent les qualités physico-chimiques de la chitine produite par extraction biologique, ce qui limite la possibilité de comparer les qualités de notre produit. Gartner et al. (2010), mesurent le DA du chitosan obtenu suite à l'extraction enzymatique de la chitine par la papaïne. Le DA est mesuré par titration à 19,1 % tandis que le chitosan obtenu par extraction chimique présente un DA de 31,4 % (estimé par RMN). La papaïne semble donc avoir un fort pouvoir de désacétylation. La chitine obtenue par l'action de la pepsine n'a pas été convertie en chitosan et ne peut donc pas être comparée à ces résultats.

II.2. Degré de polymérisation

La production de résidus glycosidiques, mesurée dans la phase soluble (Cf. chapitre 3, section VII) suggère que la dépolymérisation est initiée dès le début de l'extraction enzymatique, puis se stabilise. Pour le confirmer, les mesures de viscosité intrinsèque traduisent l'évolution de la masse molaire, directement liée au degré de polymérisation. Néanmoins, cette méthode s'est révélée peu précise pour nos produits. De surcroît, la difficulté à dissoudre intégralement les échantillons dans le DMAC peut induire des erreurs de mesures (Cf. chapitre 2.III.2.1). Les incertitudes associées à ces résultats sont de l'ordre de $5 \cdot 10^4$ g/mol. Les résultats des principaux produits sont présentés par la figure IV.5 :

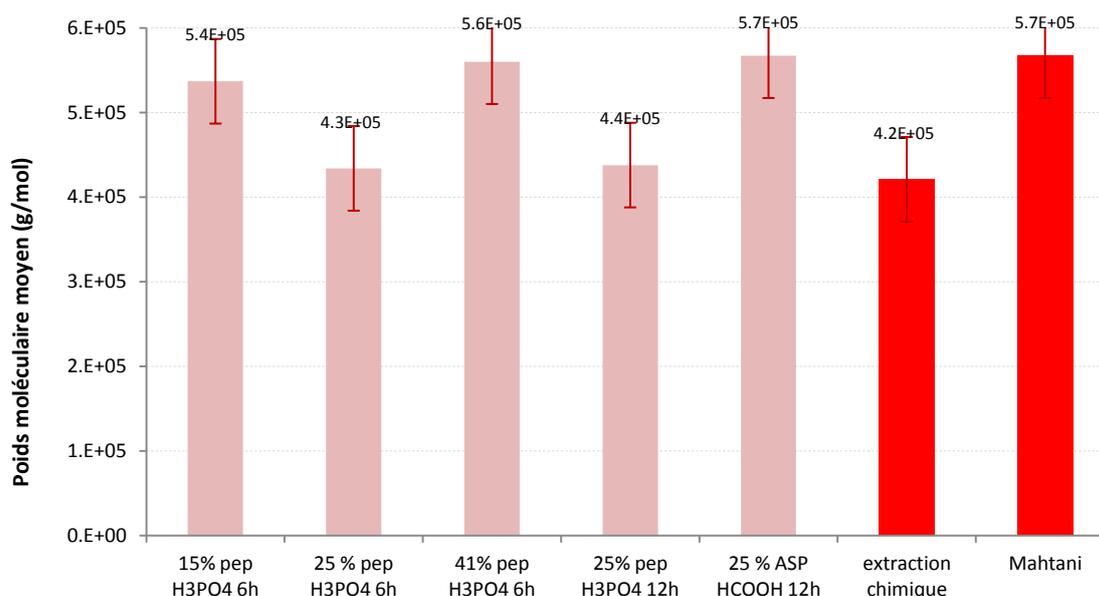


Fig.IV.5 : Degré de polymérisation des principales chitines produites par voie enzymatique et chimique

Comme pour le degré d'acétylation, la mesure du poids moléculaire n'a pas d'intérêt sur la matière première car la chitine doit être purifiée pour établir la mesure. La présence de tout autre composé perturbe la mesure de la viscosité, ainsi que la présence d'humidité.

Quel que soit le produit, la masse molaire se situe entre $4,2$ et $5,8 \cdot 10^5$ g/mol. Celle des chitines de référence varient entre $4,2$ et $5,7 \cdot 10^5$ g/mol pour la chitine extraite au laboratoire et celle fournie par Mahtani respectivement. Cette dernière est produite par une longue extraction chimique, plus de 24 h, à une température plus faible que celle fixée au laboratoire (90 °C contre 50 °C par Mahtani). Ceci illustre bien l'importance des conditions de production sur la qualité de la chitine finale et rend difficile la comparaison entre les différents modes de production.

Les poids moléculaires des chitines issues des trois hydrolyses de 6 h, par 15, 25 et 41 % de pepsine en acide phosphorique, sont de $5,4 \cdot 10^5$; $4,3 \cdot 10^5$ et $5,6 \cdot 10^5$ g/mol respectivement. La concentration en enzyme ne semble donc pas responsable de la diminution du degré de polymérisation. Après 6 h et 12 h d'hydrolyse par 25 % de pepsine, le poids moléculaire de la chitine atteint respectivement près de $4,3$ et $4,4 \cdot 10^5$ g/mol. Ces valeurs sont proches. On ne

peut donc pas conclure que l'augmentation de la durée d'hydrolyse entraîne une diminution du degré de polymérisation. Enfin, l'emploi de l'enzyme ASP en acide formique confirme son potentiel pour la production de chitine. Le poids moléculaire demeure élevé et similaire à celui de la chitine fournie par Mahtani. À ce niveau, le procédé enzymatique ne présente donc pas d'avantage par rapport à son homologue chimique.

II.3. Degré de cristallinité

L'indice de cristallinité a une incidence sur l'accessibilité des groupes amines du chitosan, donc sur les propriétés rhéologiques du polymère. Dans le domaine du traitement de l'eau, un faible indice de cristallinité est recherché (Aranaz, 2010). La figure IV.6 présente les différences de cristallinité entre les principaux produits :

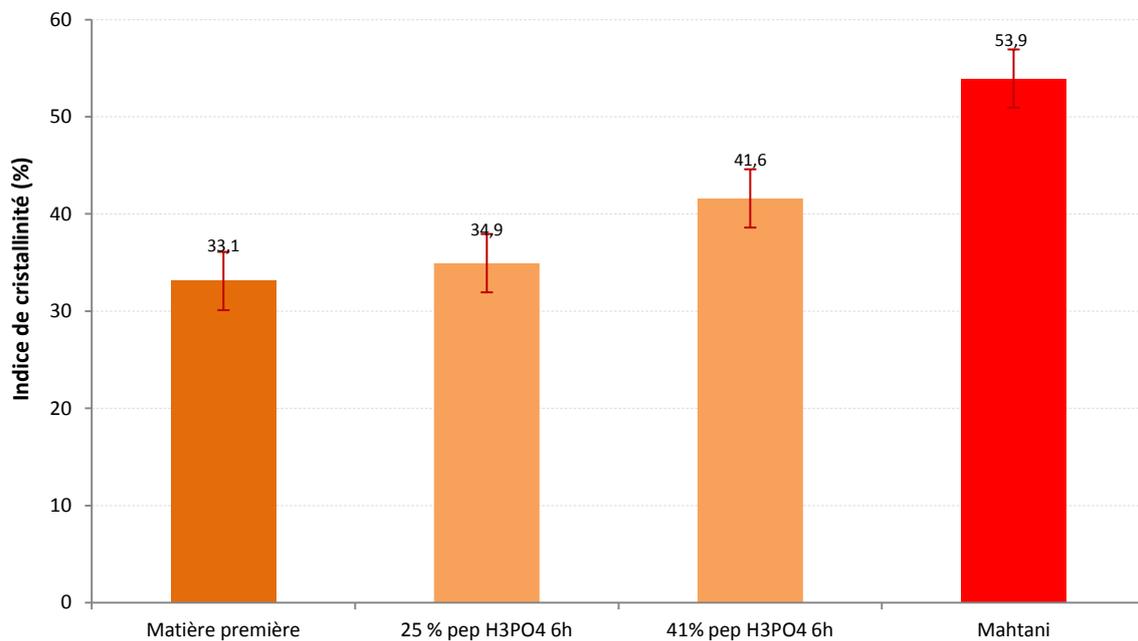


Fig.IV.6 : *Indice de cristallinité des principales chitines produites par voie enzymatique et chimique*

La chitine commerciale, telle que celle fournie par Mahtani, présente un indice de cristallinité élevé par rapport à la cristallinité de la matière première. Ces indices atteignent 53,9 et 33,1 % respectivement pour la chitine commerciale et la matière première (exosquelettes de crevette).

Les produits des hydrolyses par la pepsine en acide phosphorique sont nettoyés au NaOH, 1 h à 90 °C. À la suite de cette étape, les indices de cristallinité mesurés sont de 34,9 % et 41,6 % pour 25 % et 41 % de pepsine respectivement. L'augmentation de la concentration en pepsine semble augmenter l'indice de cristallinité de la chitine. Les mesures sur les autres produits n'ont pas été effectuées, ce qui limite les conclusions sur l'impact de l'hydrolyse enzymatique sur ce critère de qualité. Au regard de ces résultats, il serait intéressant de les approfondir afin de valider ce qui semble être un avantage de l'extraction enzymatique par rapport à la voie chimique.

Gartner et al. (2010) ont comparé les degrés de cristallinité du chitosan issu de la conversion

de chitine chimique et enzymatique (par la papaïne). Ils montrent que l'indice de cristallinité du chitosan biologique est plus bas que son homologue chimique, mais supérieur à la référence commerciale. Les conditions d'extraction de la chitine ont un impact important sur son indice de cristallinité, y compris au sein d'un même procédé. Dès lors, il est difficile d'opposer la voie enzymatique à la voie chimique.

II.4. Stabilité thermique

L'analyse thermogravimétrique est généralement utilisée pour mesurer le degré d'hydratation des polymères. Celui de la chitine extraite par voie chimique est compris entre 5 et 8 % d'après l'analyse de nos produits, ce qui coïncide avec le degré d'hydratation de la chitine commerciale et ceux cités par la littérature. En effet, le degré d'hydratation de la chitine est de l'ordre de 7 % selon Belamie (1998) et de 8 % pour la chitine fournie par Mahtani.

Pour cette étude, l'analyse thermogravimétrique a été exploitée d'une part pour estimer le degré de pureté, en complément des autres méthodes, et d'autre part pour qualifier les comportements thermiques des produits d'extraction enzymatique. L'ATG est appliquée à la chitine commerciale (fournie par Mahtani) et au produit de 6 h d'extraction enzymatique selon les conditions modèles et à la chitine (Fig.IV.6). Avant l'analyse, le produit a été nettoyé par le traitement chimique au NaOH.

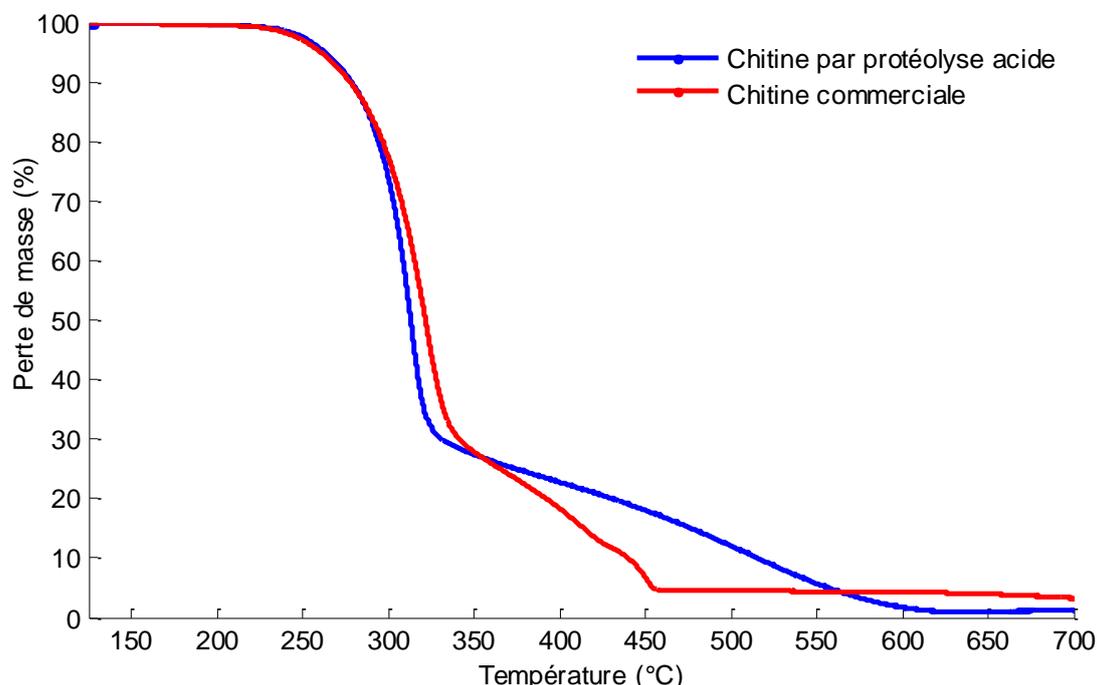


Fig.IV.7 : Profils d'ATG de la chitine commerciale (Mahtani) et du produit de l'extraction enzymatique modèle

La figure IV.7 illustre les similitudes et les différences de stabilité thermique entre les deux produits. Jusqu'à près de 300 °C, les deux profils ne présentent pas de différences. La perte de masse est négligeable jusqu'à 210 °C. Puis une dégradation thermique importante est constatée. Ainsi plus de 68 % de la masse sont perdus entre 325 °C et 335 °C pour le produit de l'extraction enzymatique et chimique respectivement. À ce stade de la température, les

écarts de pertes de masse entre les deux produits sont minimes. Ensuite, le produit d'extraction enzymatique présente une stabilité plus importante, sa dégradation thermique est lente jusqu'à 620 °C. Tandis que son homologue est complètement dégradé avant 450 °C. Seule persiste la masse résiduelle des minéraux. La même démarche a été appliquée par Gartner et al. (2010) pour comparer leur produit d'extraction chimique à celui de l'hydrolyse par la papaïne. La perte de masse de la chitine enzymatique nécessite également une augmentation plus importante de la température. On constate également une moindre quantité de minéraux résiduels.

Cette meilleure stabilité thermique du produit enzymatique pourrait s'expliquer par leur différence de cristallinité. Pour des applications industrielles, le critère déterminant est principalement la température initiale de dégradation thermique. À ce titre, les deux produits ne présentent pas de nettes différences.

III. Comparaison des mécanismes d'extraction

L'évolution de la structure du substrat après l'extraction enzymatique peut être observée par microscopie électronique. La littérature fournit des micrographies de MEB (microscopie à balayage électronique) de la structure d'exosquelette de crustacés. Certains clichés sont décrits au chapitre 1, section IV.2 (Pillai, 2009). D'autres concernent l'exosquelette de crabes décalcifiés. Ils sont comparés aux micrographes de MEB appliqués aux produits d'extraction enzymatique. De fortes similarités sont observées, telles que la structure en nids d'abeille et la présence de canules transversaux (Fig.IV.8). Ces canaux protéiques ont un rôle dans le transport des composés qui transitent d'une extrémité à l'autre de l'exosquelette.

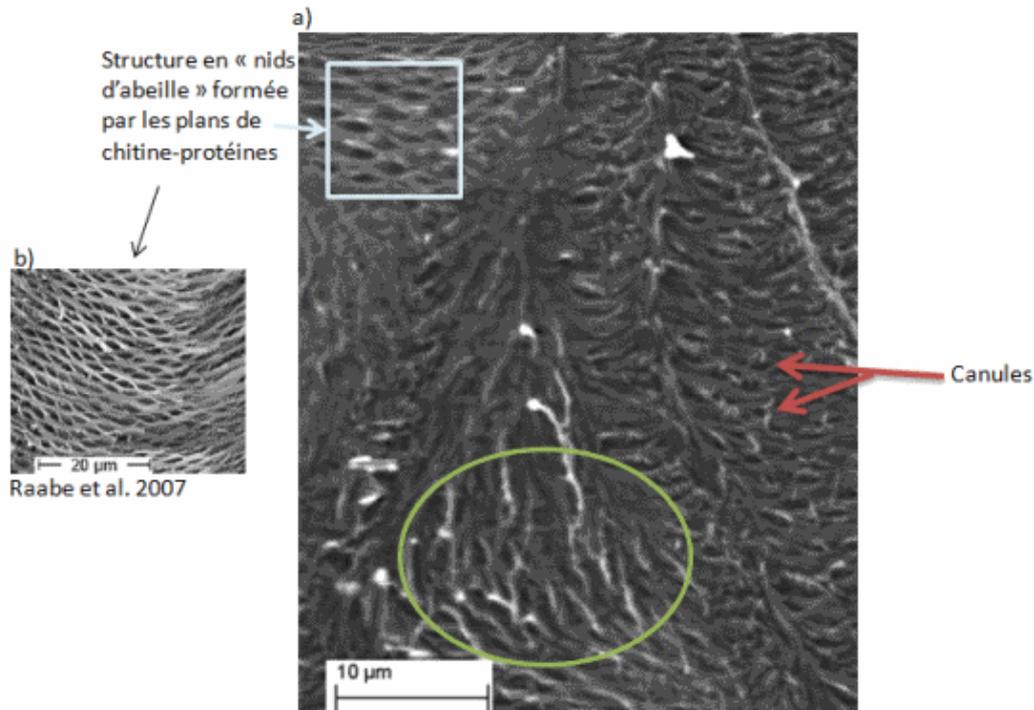


Fig.IV.8 : Micrographies de MEB du produit de 6 h d'hydrolyse par 25 % de pepsine à 40 °C

Sur la figure IV.8, la zone encadrée désigne une structure en nids d'abeille comparable à celle

décrite dans la littérature (Raabe et al. 2007). L'organisation semble donc être maintenue malgré la réaction enzymatique. Cependant les produits issus de la protéolyse acide présentent une régularité des angles de rotation des plans de chitine-protéines moins ordonnée que celle décrite dans les cuticules (Fig.IV.9).

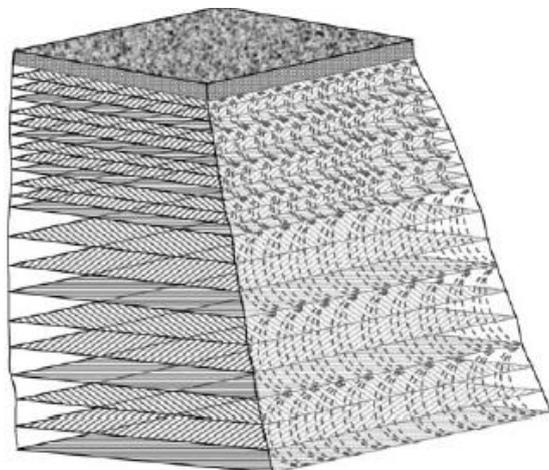


Fig.IV.9 : Organisation schématique de la cuticule de homard, coupe transversale, Raabe et al. 2006

On peut également observer une zone où la structure des plans de chitine-protéines n'est plus maintenue (zone encerclée). En revanche, on y observe toujours la présence de fibres (en clair) davantage allongées, probablement des fibres de chitine. Bien qu'aucune donnée ne précise le degré de représentativité de cet échantillon, l'organisation de la structure de la cuticule semble donc partiellement maintenue par la protéolyse acide. À titre de comparaison, Gartner et al. (2010) ont conclu à une déstructuration complète de la matrice par l'hydrolyse à la papaïne. D'après leurs prises de microscopie électronique à balayage, la déstructuration de la cuticule des crevettes est plus importante par l'action de la papaïne à 2 % (w/w de coproduits humide) que par l'extraction chimique. Nous nous sommes également intéressés à l'impact des deux étapes clé de l'extraction chimique sur la structure des cuticules de crevettes (Fig.IV.10).

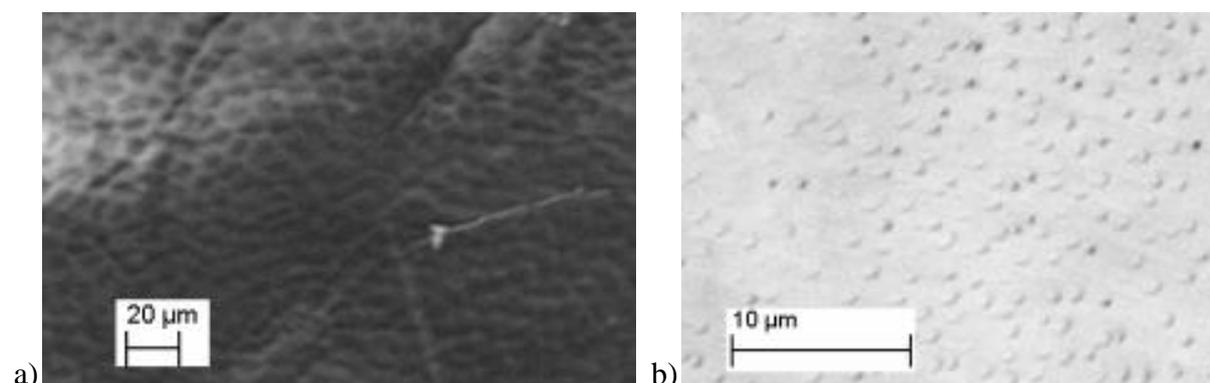


Fig.IV.10 : Micrographes de MEB d'exosquelettes soit déminéralisés (a) ou déprotéinisés (b) par traitement chimique

Bien que les micrographes présentés par la figure IV.10 soient de qualité moyenne, ils permettent d'apprécier les conséquences des différents traitements chimiques sur les cuticules de crevettes.

D'une part, suite à la déminéralisation par l'acide chlorhydrique à température ambiante, le « pavage » spécifique des coupes longitudinales est reconnu (Fig.IV.10.a). Cette structure est également schématisée par la figure IV.11 pour faciliter la comparaison. Les contours des pavés sont délimités par les fibres de chitine-protéines, présentent malgré le traitement chimique.

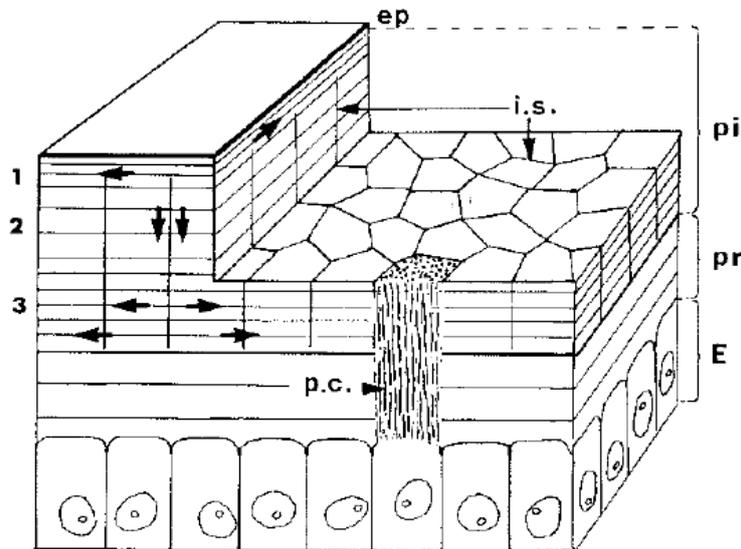


Fig.IV.11 : Schéma de la cuticule des crustacés, ep = épicuticule, pi = couche pigmentaire, pr = couche principale, E = cellules épithéliales, p.c. = canaux de ports transversaux, i.s. = septum interprismatique, Giraud-Guille, 1984

D'autre part, après déprotéinisation chimique par l'hydroxyde de sodium à 90 °C, on distingue une multitude de microfibrilles de chitine, parsemées de microcristaux de carbonate (Fig.IV.10.b). Le manque de netteté des micrographies invite à la prudence quand à cette analyse. De plus, il est nécessaire de connaître la part de représentativité de cette zone. Néanmoins, il est évident que le traitement chimique altère différemment la structure de la matière première, comparé à l'extraction enzymatique (Fig.IV.8).

IV. Valorisation de la phase soluble

IV.1. Analyse du poids moléculaire des peptides solubles

La protéolyse libère les protéines et réduit leur taille en peptides. Après la filtration, ils sont concentrés dans la fraction liquide. Le profil de distribution de leur poids moléculaire est déterminé par chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance (HPLC).

La séparation a été obtenue à l'aide d'une colonne (Superdex peptide 10/300GI). La colonne a été calibrée à l'aide des standards suivants: Ribonuclease (13 700 Da), Aprotinin (6 500 Da), Renin (1 760 Da), Vasopressine (1 084 Da) et Leucine (294 Da). L'échantillon est préparé à partir d'une solution à 2 mg/ml et dilué dans 20 ml de solution tampon de NaCl 50 mM contenant 5 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). Cette solution tampon constitue la phase mobile. Après 15 min de traitement aux ultra-sons, l'échantillon est filtré

(filtre de 0,45 µl). Le volume injecté dans la colonne est de 80 µl et le débit d'élution est de 0,5 ml/min. Les composés sont détectés par une lecture de la densité optique à 214 nm.

La colonne employée est spécifique aux peptides dont le poids moléculaire est compris entre 7000 et 100 Da, ce qui couvre à une large gamme de peptides présents dans la phase solubles. Bien qu'elle ne soit pas complète, cette couverture suffit à estimer l'impact de la protéolyse. Le graphique suivant illustre l'évolution de la répartition des catégories de poids moléculaires selon la durée d'hydrolyse enzymatique pour la cinétique de référence (25 % de pepsine et 40°C) :

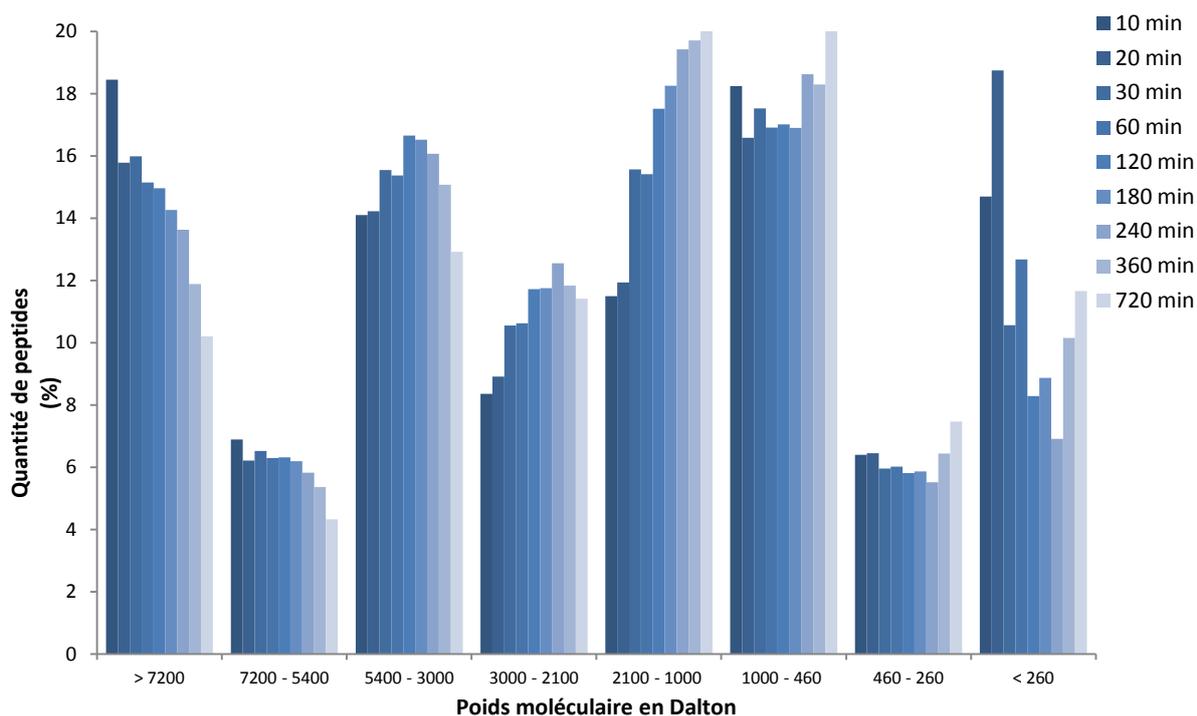


Fig.IV.12 : Évolution des poids moléculaire des peptides solubles produits par l'extraction enzymatique (par 25 % de pepsine, en acide phosphorique, à 40 °C) selon la durée d'hydrolyse

La légende de la figure IV.12 exprime l'augmentation des durées d'hydrolyse par l'intensité de couleur décroissante. Les peptides volumineux tels que ceux dont le poids moléculaire est supérieur à 5400 Da, diminuent au fur et mesure que la durée d'extraction enzymatique augmente. À l'inverse, les catégories de peptides de 3000 à 2100 Da et 2100 à 1000 Da s'étoffent à mesure que le temps d'hydrolyse s'allonge.

Les quantités de peptides des catégories poids moléculaires de 1000 à 460 Da et 460 à 260 Da n'évoluent quasiment pas. On peut néanmoins remarquer une tendance à leur augmentation lorsque la durée d'hydrolyse est de 12 h. Enfin, l'évolution des catégories de poids moléculaires de 5400 à 3000 Da et inférieurs à 260 Da n'est pas constante. Elle suggère une réduction de taille des peptides d'abord vers la catégorie de 5400 à 3000 Da, jusqu'à 120 min d'hydrolyse. Puis, au-delà de 180 min, la réduction des peptides enrichie les catégories de 3000 à 1000 Da.

La masse molaire de la pepsine est de l'ordre de 34,5 kDa (Chapitre 3, III.1) c'est-à-dire dans la première catégorie. Elle est responsable de la protéolyse et par conséquent sa masse molaire ne devrait pas évoluer. La présence de pepsine n'interfère donc pas l'évolution des catégories de poids moléculaires étudiés.

L'activité antimicrobienne des peptides est reconnue pour ceux dont les poids moléculaires sont généralement compris entre 5 et 1 kDa (Zo, 2011). Pour nos produits, ces catégories couvrent entre 33 et 48 % des peptides, ce qui renforce le potentiel de valorisation de la phase soluble. Le poids moléculaire des pénaedines, protéines de crevettes *P. vannamei*, à forte activité antimicrobienne (Destoumieux et al. 2000), est de l'ordre de 6 kDa. Cette catégorie est estimée entre 4,3 et 6,9 % des peptides. Un test d'activité antimicrobienne a été réalisé sur une gamme de microorganismes qui est décrite dans le tableau suivant :

Références	Espèces	Conditions
RF 151	<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI, 20 °C
RF 173	<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI, 37 °C
RF 174	<i>Escherichia coli</i>	BHI, 20 °C
RF 182	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BHI, 20 °C
RF 186	<i>Salmonella</i>	BHI, 20 °C
RF 36	<i>Carnobacterium divergens</i>	BHI, 20 °C
EU 2183	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	BHI+2,5 % NaCl, 15 °C, 48 h
EU 2185	<i>Shewanella putrefaciens</i>	BHI, 25 °C
EU 2189	<i>Pseudomonas</i>	BHI, 20 °C
EU 2206	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	BHI, 20 °C
EU 2202	<i>Lactobacillus sakei</i>	MRS, 26 °C

Tab.IV.2 : Liste des bactéries utilisées par les tests d'activités antimicrobienne de la phase soluble

Pour préparer la solution, la prise d'échantillon est diluée au 1:2 (poids/volume). Des spots de 10 µl ont été déposés sur les boîtes de pétri où les bactéries se développent. Aucune activité antibactérienne n'a été observée.

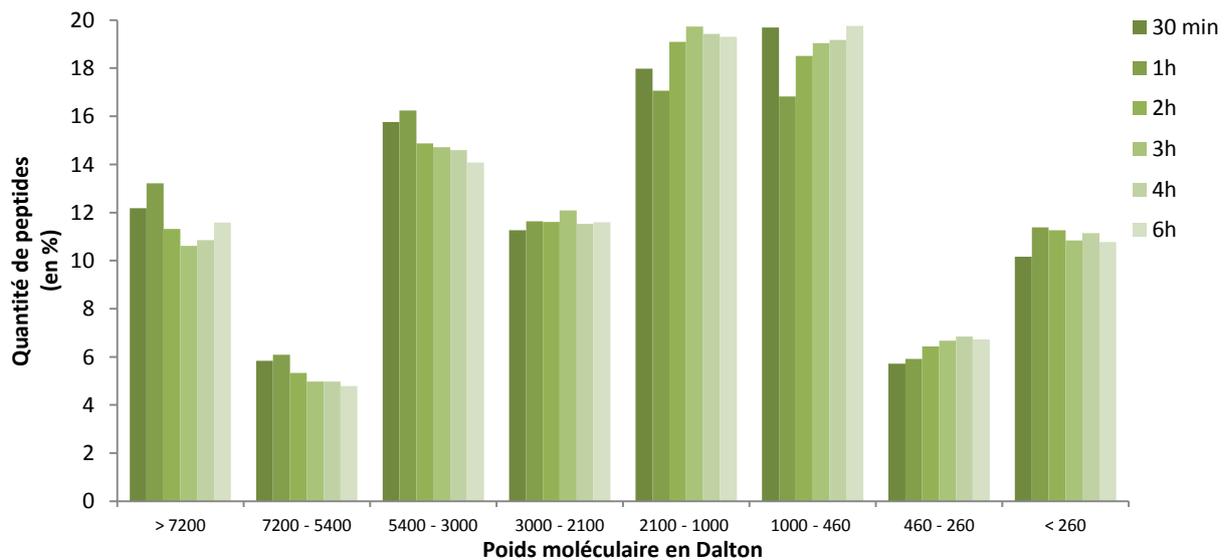


Fig.IV.13 : Évolution des poids moléculaire des peptides solubles produits par l'extraction enzymatique (par 41 % de pepsine, en acide phosphorique, à 40 °C) selon la durée d'hydrolyse

La figure IV.13 présente l'évolution des poids moléculaires lorsque l'hydrolyse enzymatique

est menée par 41 % de pepsine. On observe également une domination des catégories de peptides de poids moléculaire compris entre 2 100 et 460 Da, avec puis de 5 400 à 3 000 Da. À la différence de la précédente analyse, les poids moléculaires sont assez stables en fonction de la durée d'hydrolyse enzymatique. On note une faible diminution de 16 % à 14 % pour la catégorie de 5 400 à 3 000 Da, tandis que celle de 460 à 260 Da présente une augmentation de 6 % à 7 %. Ces faibles variations semblent indiquer que la protéolyse exercée par la pepsine est limitée. Ceci confirmerait l'effet d'allostérie négative évoquée au chapitre 3, section V.3. Par ailleurs, la part des peptides à potentiel d'activité antimicrobienne, de 5400 à 1000 Da, atteint près de 45 % en moyenne.

Les poids moléculaires des peptides de la phase soluble issue de l'hydrolyse enzymatique par l'ASP en acide formique ont également été observés au cours du temps (Fig.IV.14).

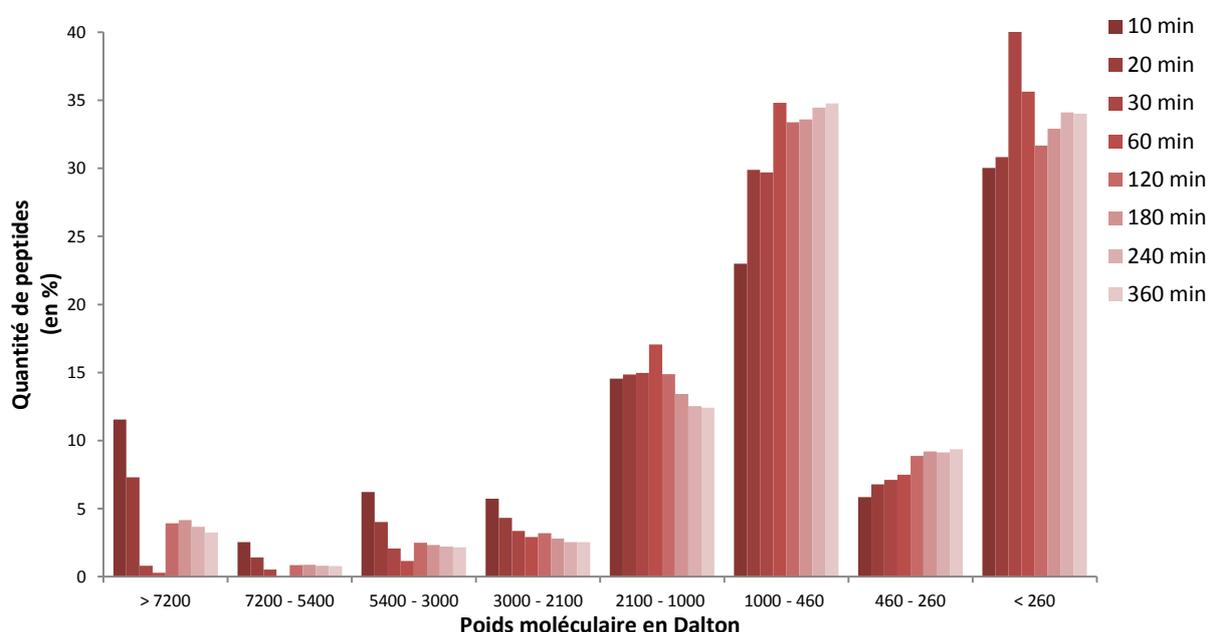


Fig.IV.14 : Évolution des poids moléculaire des peptides solubles produits par l'extraction enzymatique (par 25 % d'ASP en acide formique à 40 °C) selon la durée d'hydrolyse

Cette évolution des poids moléculaires se distingue nettement de la précédente hydrolyse. On observe une diminution des peptides de poids moléculaires de 1000 à plus de 7200 Da en fonction de la durée d'hydrolyse. Le produit d'une heure d'hydrolyse est singulier par rapport aux autres produits de la cinétique. La protéolyse par l'ASP semble réduire davantage les peptides par rapport à l'utilisation de la pepsine.

Une augmentation des peptides, en fonction du temps d'hydrolyse, est observée pour les catégories de poids moléculaire inférieur à 1000 Da. Par rapport à la précédente hydrolyse, les peptides produits présentent donc un poids moléculaire inférieur. La protéolyse semble plus active par l'ASP par rapport à la protéolyse par la pepsine. Dès 10 min, les produits solides de l'hydrolyse présentent des peptides de poids moléculaires très faibles. La part des peptides inférieurs à 1000 Da couvre 59 % à 78 %, pour 10 min à 6 h d'hydrolyse respectivement.

La part des peptides susceptibles de présenter une activité antibactérienne varie de 26 % à 11 % selon la durée d'hydrolyse enzymatique. La différence de répartition des poids moléculaires en fonction des deux enzymes montre que leur mode de protéolyse est différent et suggère que les activités des peptides libérés soient également différentes.

IV.2. Evolution de l'élimination des acides aminés dans le résidu solide

La déprotéinisation peut être suivie acide aminé par acide aminé grâce à leur dosage par CPG. C'est le cas de la cinétique d'hydrolyse enzymatique par 25 % de pepsine en acide phosphorique (Fig.IV.15).

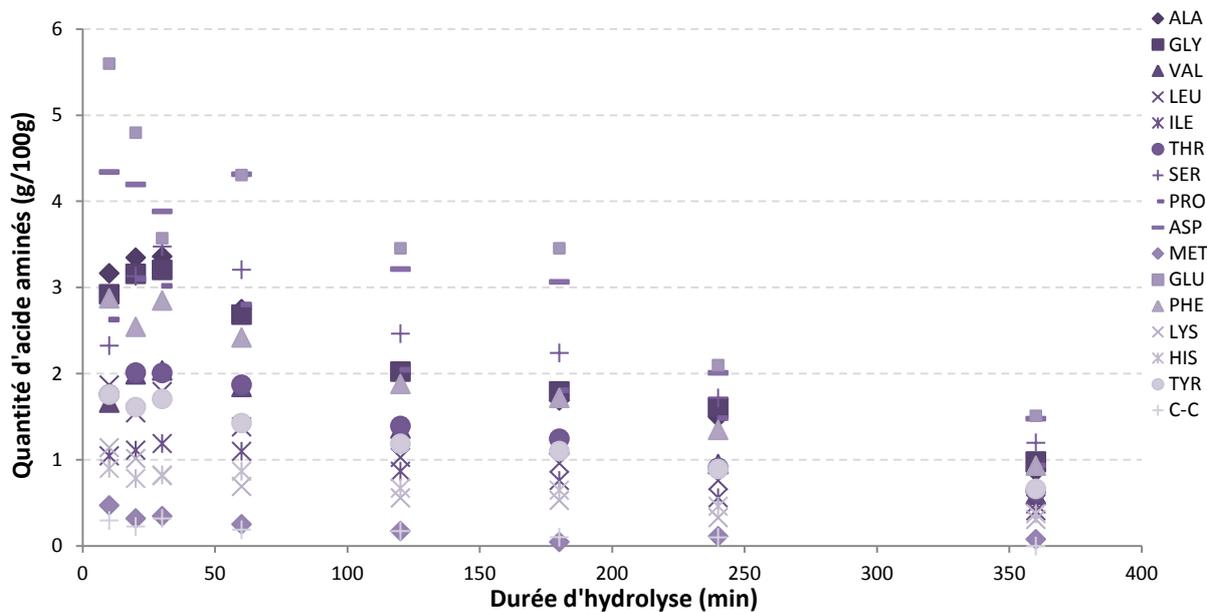


Fig.IV.15 : Quantités d'acides aminés résiduels dans les produits insolubles de l'extraction enzymatique par 25% de pepsine à 40°C (petite taille) en fonction de la durée d'hydrolyse

La figure IV.15 montre que la part respective de chaque acide aminé semble converger vers zéro sans l'atteindre. On n'observe pas de phase de stabilisation et la plupart des cinétiques semblent présenter une vitesse constante différente en fonction de l'acide aminé.

Les regroupements acide glutamique/glutamine d'une part et acide aspartique/asparagine d'autre part, sont majoritaires. La serine, la lysine, l'histidine et la tyrosine sont les moins représentés. La cystéine et la méthionine sont toujours faiblement détectées. L'analyse de la matière première présentait les mêmes caractéristiques (Chapitre 2, Fig.II.1). Ces comparaisons traduisent que la pepsine élimine indifféremment les acides aminés présents initialement dans la matière première, sans préférence pour les acides aminés aromatiques.

Les acides aminés essentiels présents dans la phase soluble représentent en moyenne $36,3 \pm 0,7$ % du total des acides aminés dosés (d'après la cinétique modèle à 25 % de pepsine). Il est difficile de comparer ce résultat aux autres études d'extraction biologique de la chitine car les modes opératoires sont très différents. À partir de coproduits de *P. vannamei*, Armenta et Gueretto-Lagarreta (2009) ont mesuré une composition en acides aminés essentiels de 46,6 %

et 48,7 % respectivement dans la matière première non fermentée et fermentée par des bactéries lactiques. L'analyse a été réalisée par HPLC. Dans une autre étude, Rao et al. (2005) mesurent 32,1 % d'acides aminés essentiels dans les hydrolysats de coproduits de crevettes (têtes et carapace).

IV.3. Résidus glycosidiques

Les résidus glycosidiques comprennent ici tous les oses simples, initialement présents dans le substrat ou issus de la décomposition de la chitine ou des glycoprotéines sous l'action de l'extraction enzymatique. Une telle décomposition se traduirait principalement par une augmentation de N-acétyl-glutamine. Ils sont d'abord dosés par la méthode de Dubois. Elle est complétée par une analyse qualitative et quantitative par chromatographie en phase gazeuse (Cf. Chapitre 2, I.6.3). Les résultats sont détaillés ci-dessous (Fig.IV.16) :

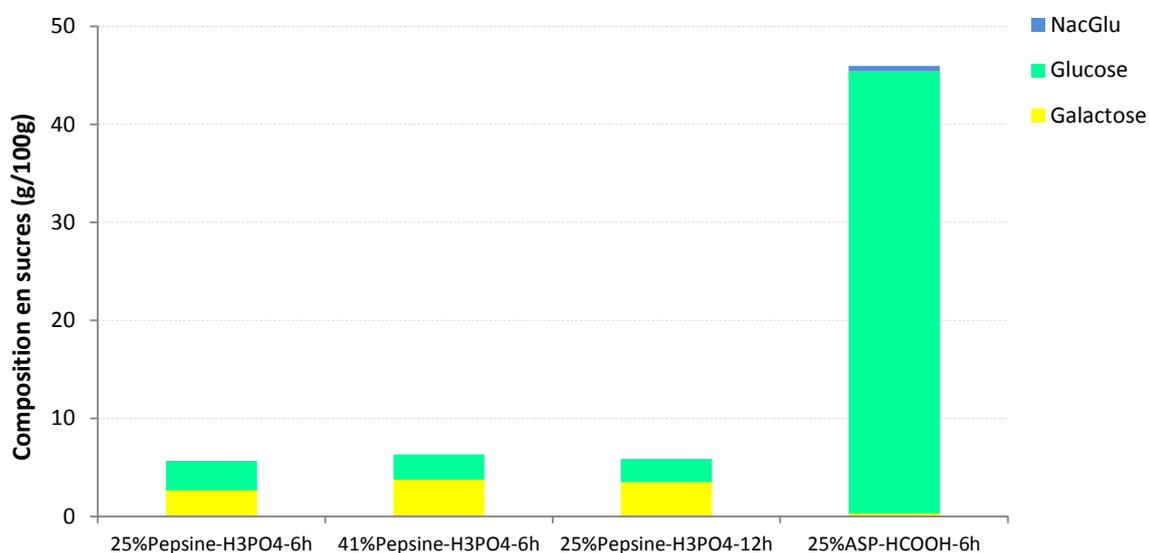


Fig.IV.16 : Répartition des catégories de résidus glycosidiques dans la phase soluble des extractions enzymatiques

Dans le cas de l'extraction modèle, la teneur totale en résidus glycosidiques atteint $5,7 \pm 0,8$ g pour 100 g de la phase soluble. Ils se déclinent en 2,6 g/100 g de galactose, 3,0 g/100 g de glucose et 0,1 g/100 g de glucosamine, acétylées ou non. Ceci représente respectivement près de 46 %, 53 % et 1 % des résidus glycosidiques. La part des glucosamine et N-acétyl-glucosamine est très faible, ce qui indiquerait une absence de dépolymérisation.

D'après la figure IV.16, suite à l'augmentation de la concentration en pepsine jusqu'à 41 %, la teneur totale en résidus glycosidiques atteint $6,3 \pm 0,2$ g/100 g de phase soluble. Bien que légèrement supérieure à la teneur en résidus glycosidiques de l'hydrolyse par 25 % de pepsine, cette augmentation est comprise dans l'incertitude des mesures. La composition en résidus glycosidiques se répartit entre 59 % de galactose, près de 40 % de glucose et moins de 1 % de glucosamine acétylée ou non.

La même répartition est constatée lorsque la durée d'extraction est allongée jusqu'à 12 heures.

La teneur total en résidus glycosidiques atteint alors $5,8 \pm 0,5$ g/100 g de phase soluble. Cette quantité est similaire aux précédents résultats. La part de glucosamine/N-acétyl-glucosamine demeure toujours très faible, inférieure à 1 %.

L'extraction par 25 % d'ASP 6 h, produit une teneur totale en résidus glycosidiques de $46,0 \pm 1,1$ g/100 g de phase soluble. Elle comprend plus de 98 % de glucose puis près de 1 % de galactose et Glu/NacGlu chacun. Ceci montre que l'emploi du couple ASP/acide formique à une action différente du couple pepsine/acide phosphorique sur la déprotéinisation. Par conséquent, la composition de la phase soluble est complètement modifiée.

IV.4. Pigments

IV.4.1. Quantité de lipides et d'astaxanthine dans la phase soluble

Parmi les pigments d'origine marine (Chapitre 1, VIII.1.2), les caroténoïdes sont majoritaires dans les exosquelettes des crustacés, dont principalement l'astaxanthine (Babu et al, 2008).

La proportion de lipides dans la phase soluble, récupérée après 6 heures d'extraction par 25 % de pepsine, représente $2,7 \pm 0,3$ %. Cette quantité correspond à plus de 100 % de la quantité de lipides initialement présente dans la matière première. Compte tenu des incertitudes liées aux mesures, ceci signifie que tous les lipides passent en phase soluble.

D'après Auriolles-Gamboa et al. (2004), la quantité d'astaxanthine est corrélée à celle des lipides totaux dans l'exosquelette de crabe selon la relation suivante :

$$[\text{Astaxanthine}] = - 0,9849 + 0,08499*[\text{Lipides}] \quad (\text{IV.1})$$

L'analyse qualitative des caroténoïdes a été réalisée par le laboratoire Agrobio (Rennes), par HPLC couplée à la spectrophotométrie UV/VIS (Fig.IV.17). La quantité d'astaxanthine a été mesurée à $8,0$ µg par gramme de phase soluble lyophilisée. L'astaxanthine est le caroténoïde majoritaire, cependant d'autres sont visibles sur le spectre de la figure IV.17, certainement des xanthophylles. Les autres lipides n'ont pas été identifiés, ils peuvent être des phospholipides ou des acides gras complexés sous forme de glycolipidiques et lipoprotéiques. Gartner et al. (2010) font part de la présence de palmitate, oléate, linoléate et esthérate de méthyle. Par ailleurs, la teneur total en lipide, mesurée dans cette étude, est supérieur à celle déterminée dans notre matière première, 8 % contre 3,3 % respectivement.

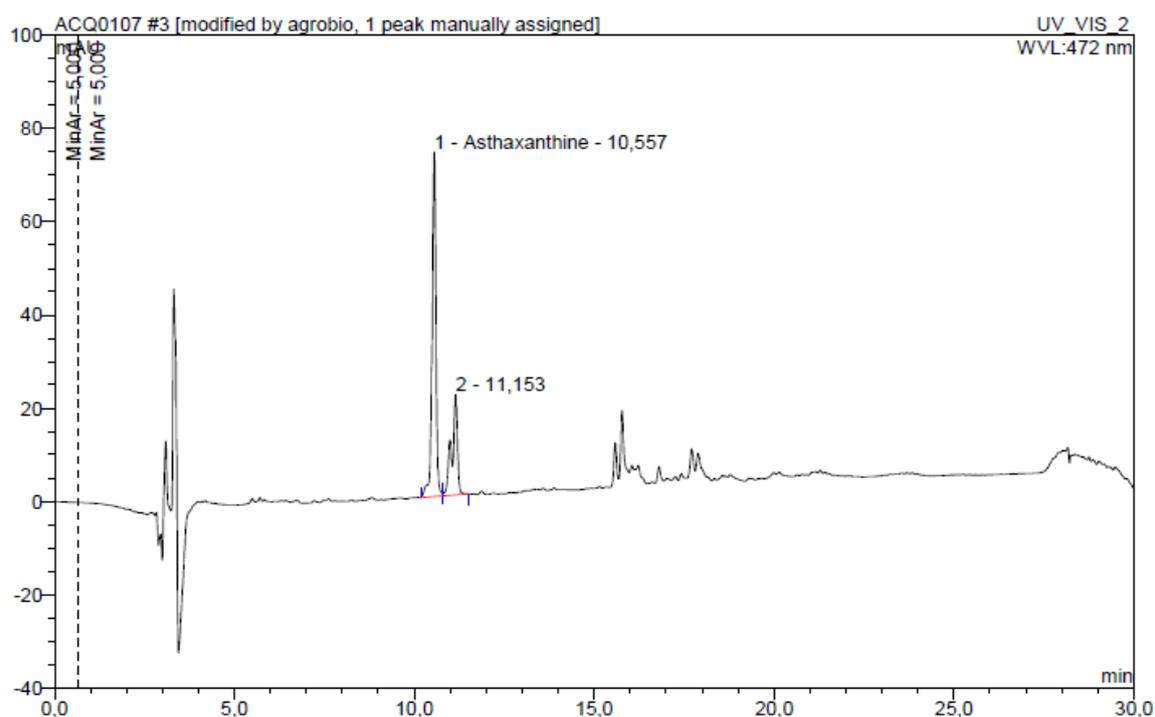


Fig.IV.17 : Caroténoïdes présents dans la phase soluble de l'hydrolyse à 25 % de pepsine, 6 h à 40 °C.

La teneur en astaxanthine observée correspond à 1,17 µg/g de substrat initial. Cette teneur est faible comparée à celle obtenue par Gildberg et al. (2001). Leur hydrolyse enzymatique par alcalase (pendant 2 h à 40 °C) à partir de crevettes nordiques, *Pandalus borealis*, est suivie d'une centrifugation. Dans le culot, 1 500 µg d'astaxanthine est récupéré. Ainsi, leur rendement en astaxanthine atteint près de 40 %. Pour comparer le résultat de Gildberg et al. (2001) au nôtre, une centrifugation de la phase soluble devrait être appliquée.

La teneur en astaxanthine de nos coproduits de crevette n'a pas été mesurée, cependant, la littérature offre cette donnée. Dans les exosquelettes de crevettes, selon l'espèce, la teneur en caroténoïdes totaux varie de 59,8 à 104,7 µg/g (Sachindra et al. 2005). Ce qui nous mènerait à un rendement autour de 1 à 2 % à l'issue de l'extraction par 25 % de pepsine à 40 °C.

La comparaison avec les autres études similaires est difficile due aux différences de procédés d'extraction. L'hydrolyse, par la pepsine, de quatre coproduits de crevettes différentes (*P. monodon* sauvage et d'aquaculture, *P. indicus* et *P. monoceros*), menée par Babu et al. (2008), aboutie à des quantités de 120 jusqu'à 705 µg/g de caroténoïdes totaux récupérés. Les conditions d'hydrolyse étaient de 45 °C et le pH proche de 4. La fermentation lactique expérimentée par Bhaskar et al. (2006) à partir de coproduits de *P. monodon* atteint jusqu'à $78,5 \pm 2,3$ % de rendement en astaxanthine. Ils montrent également. D'après Armenta et al. (2009), sur *Pandalus borealis*, l'astaxanthine libre représente seulement 4 % du total des astaxanthines, tandis que les mono-esters et di-esters constituent respectivement 20 et 76 %. Des mesures complémentaires nous sont donc nécessaires pour identifier tous les caroténoïdes de nos produits.

No et al (1989) montrent que la réduction de taille de fragment de matière première réduit le degré de récupération de l'astaxanthine lors de l'extraction chimique de la chitine à partir de

coproduits de crabe. Leurs expériences portaient sur des fragments compris entre 2 et 0,2 mm. Ces résultats nous invitent à poursuivre l'analyse de la composition en astaxanthine de nos produits en fonction de la taille initiale des fragments d'exosquelette de crevettes.

La teneur en astaxanthine dans la phase soluble issue de l'extraction par 25 % d'ASP en acide formique a été mesurée à 4,2 µg/g. Cette quantité est quasiment la moitié de la celle obtenue par la précédente hydrolyse. Cependant, dans les deux cas, les teneurs en astaxanthine sont supérieures à celle observées dans la phase soluble issue de l'extraction chimique. Dans le cas du procédé traditionnel, la teneur en astaxanthine est inférieure à 2 µg/g. Ces données sont résumées dans le tableau IV.3 :

<i>Extraction</i>	<i>Teneur en astaxanthine (µg)</i>
Extraction chimique	8,0
Pepsine + H ₃ PO ₄	4,2
ASP + HCOOH	< 2

Tab.IV.3 : Comparaison des caractéristiques visuelles des résidus insolubles selon le procédé d'extraction

IV.4.2. La couleur des résidus insolubles

La phase insoluble, qui contient la chitine, doit être le plus blanc possible pour répondre au cahier de charge. D'une part, le visuel constitue un premier indicateur. Plusieurs observations ont été faites et elles sont résumées dans le tableau IV.4 :

<i>Extraction</i>	<i>Couleur</i>	<i>Aspect / texture du produit</i>
Extraction chimique	Blanc	Plastique, électrostatique
Pepsine + H ₃ PO ₄	Rose pâle	Rugueux, friable
ASP + HCOOH	Rose-orange	Rugueux, friable

Tab.IV.4 : Comparaison des caractéristiques visuelles des résidus insolubles selon le procédé d'extraction

L'aspect du produit d'extraction chimique présente les caractéristiques de référence conforme cahier des charges de la chitine commerciale.

Les produits d'hydrolyse enzymatique présentent une coloration plus ou moins prononcée, liée à la présence des protéines et pigments résiduels. Cependant leur couleur se distingue nettement en fonction de l'enzyme employée. Par la pepsine, la chitine est de couleur rose-pâle, tandis que la couleur de la chitine obtenue par l'ASP est plus foncée, dans les teintes orange doré. L'enzyme étant elle-même de cette couleur, on peut supposer qu'une partie de ses pigments se lient à la chitine.

De surcroît, l'intensité de la coloration des produits a été observée par spectrophotométrie (Cf. Chapitre 2.III.6) les facteurs de réflexions L^* , a^* et b^* sont mesurés et comparés pour trois produits :

- la chitine obtenue après lavage chimique
- la chitine obtenue par voie enzymatique, par la pepsine
- la chitine obtenue par voie enzymatique, par l'ASP

L^* traduit la clarté de la lumière ($L^* = 0$ pour le noir et $L^* = 100$ pour le blanc). Les valeurs a^* et b^* indiquent respectivement l'intensité vers le rouge et de jaunes lorsqu'elles sont positives. Le facteur WI indique également l'intensité vers le blanc. La comparaison entre ces facteurs est illustrée par la figure IV.18 :

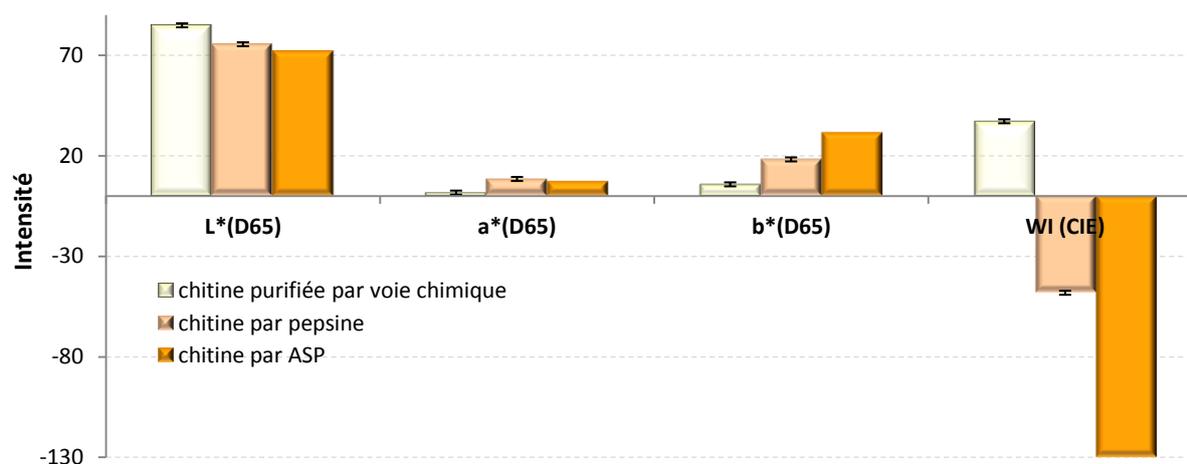


Fig.IV.18 : Comparaison des coefficients de spectrophotométrie

La figure IV.18 confirme et complète les observations du tableau IV. Le coefficient L^* est plus élevé pour la chitine chimique, avec $84,8 \pm 0,2$. Puis il diminue, dans l'ordre, pour la chitine obtenue par la pepsine et l'ASP. Les valeurs observées sont de $75,5 \pm 0,4$ et $72,0 \pm 0,3$ respectivement. Le facteur a^* , qui exprime l'intensité vers le rouge, est plus élevé lorsque la chitine est extraite par la pepsine, $8,4 \pm 0,5$, puis par l'ASP, $7,4 \pm 0,2$. Après le traitement chimique, la chitine les facteurs a^* et b^* sont plus faibles. En revanche, elle présente le coefficient WI le plus élevé, de l'ordre de $37,1 \pm 0,7$. Lorsque la voie enzymatique est empruntée, ce facteur est négatif, ce qui exprime que la couleur des produits s'éloigne du blanc. Ces caractéristiques s'apprécient visuellement sur les photographies de la figure IV.19 :



Fig.IV.19 : Chitine obtenue par lavage chimique, par hydrolyse par la pepsine et par l'ASP (de gauche à droite)

V. Conclusions du chapitre 4

- Les étapes du procédé d'extraction de la chitine à partir des coproduits de crevettes *P. vannamei* et les analyses qui suivent sont rappelées dans le schéma IV.20 :

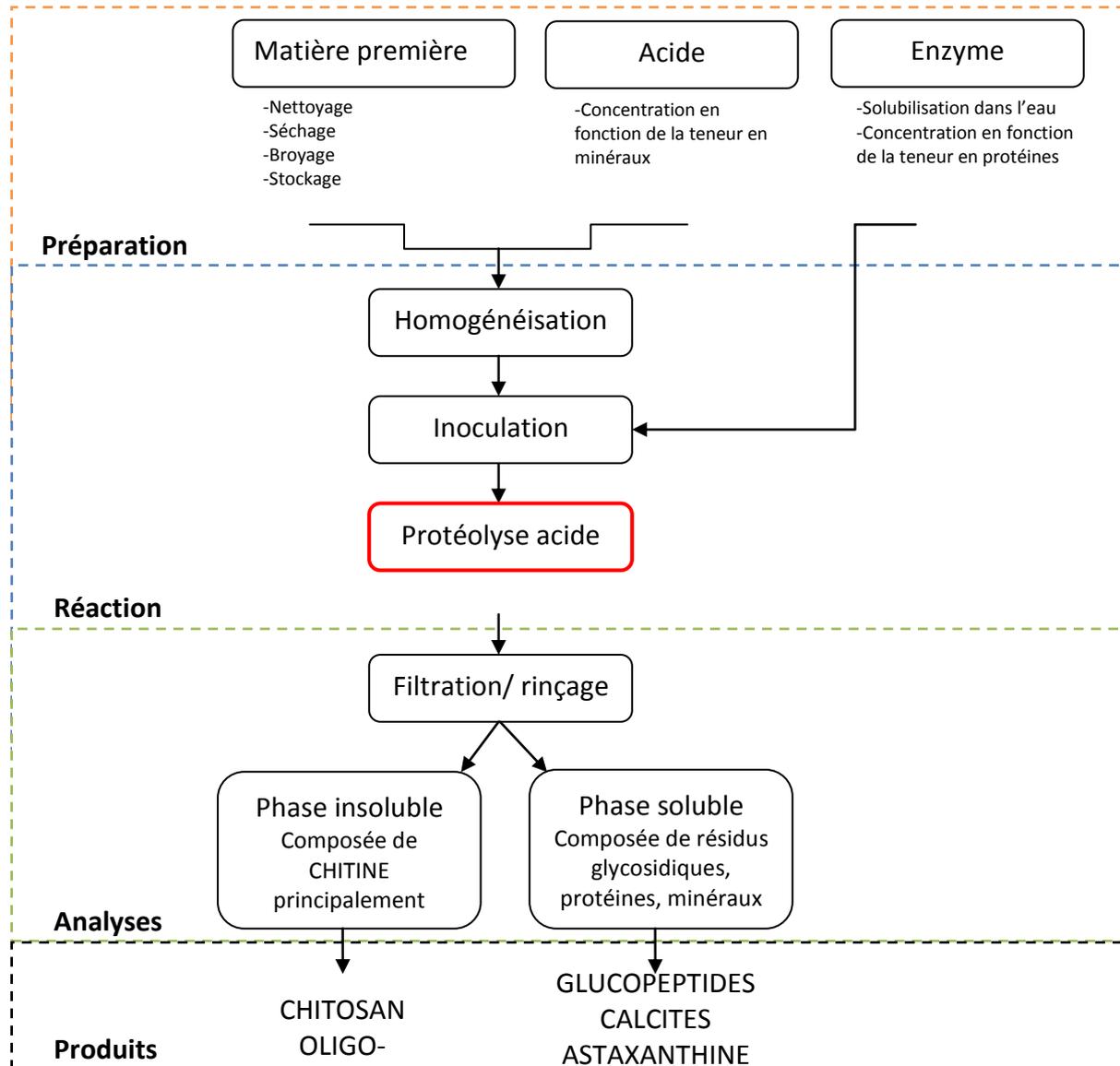


Fig.IV.20 : Schéma récapitulatif des étapes du procédé de protéolyse acide et des analyses consécutives

Les performances de ce procédé sont comparées à celle de l'extraction chimique et aux meilleures performances proposées par la littérature avec la voie fermentaire (Cf. Tab.IV.5).

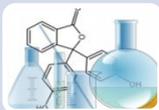
Pour éliminer les minéraux, la protéolyse acide est quasiment aussi performante que l'extraction chimique. Cette conclusion est valable dès lors où la concentration en pepsine et en ASP dépasse 25 %. La voie fermentaire donne des résultats variables selon le nombre d'étapes et les microorganismes sélectionnés. Xu et al. (2008) obtiennent moins de 1 % de minéraux résiduels après 4 jours de fermentation lactique. En termes de déprotéinisation, ils atteignent une teneur en protéines résiduelles de l'ordre de 6 %. La protéolyse acide a permis

d'obtenir un résidu solide contenant près de 9 % à 3 % de protéines résiduelles, avec la pepsine et l'ASP respectivement. La durée des protéolyses acide n'excède pas 12 h tandis que celle de la fermentation est au moins 48 h. Par conséquent, au regard de la durée, la protéolyse est avantageuse (Cf. Tab IV.5).

			
Minéraux résiduels (%)	< 1 %	< 1 %	< 1 %
Protéines résiduelles (%)	< 1 %	~ 6 %	~ 9 %
Durée	6 à 30 h	> 48 h	6 à 12 h

Tab.IV.5 : Comparaison des performances en purification de chitine en fonction du procédé

Les caractéristiques physico-chimiques des chitines obtenues sont également comparées (Tab.IV.6). Pour la voie fermentaire, les résultats présentés sont issus des travaux de Pacheco et al. (2009), contrairement aux deux autres voies, étudiées au laboratoire. L'unique paramètre qui semble se démarquer est l'indice de cristallinité.

	 Extraction chimique	 Voie fermentation	 Protéolyse acide
Degré d'acétylation (%)	95,5 ± 1%	94%	95,1 ± 1%
Masse moléculaire (g/mol)	4,2 à 5,7x10 ⁵	1,2x10 ⁶	4,3 à 5,7x10 ⁵
Indice de cristallinité	53 %	86%	35%

Tab.IV.6 : Comparaison des performances en purification de chitine en fonction du procédé

L'un des objectifs de l'étude consistait à mettre en œuvre un procédé plus respectueux des enjeux environnementaux. La production d'effluents chimiques de la protéolyse acide est comparée à l'extraction chimique (Tab.IV.7).

	Extraction chimique	Protéolyse acide
Consommation en eau (w/v)	1 :10	1 :5
Concentration en réactif	1 à 1,5 N (répété 2 fois)	< 1 N

Tab.IV.7 : Comparaison de la production d'effluents chimique en fonction du procédé

Le chapitre 4 met également en évidence la différence entre la protéolyse acide et l'extraction chimique sur la déstructuration de la matière première. D'après les micrographies de MEB, l'exosquelette des crevettes est moins dénaturé par la voie enzymatique. Des différences de couleur entre les produits finaux sont également notées entre les deux voies de purification et entre les deux couples enzyme-acide. Enfin, l'analyse des poids moléculaires des peptides des phases solubles a montré que la pepsine et l'ASP ne présentent pas le même mode d'action.

Conclusion & Perspectives

Rappel des objectifs de la thèse

Ce travail de thèse a été centré sur l'application de la protéolyse acide pour purifier la chitine à partir de coproduits de crevettes, classiquement réalisée par voie chimique.

Le principe développé repose sur l'emploi d'une protéase active en milieu acide pour réaliser simultanément la déminéralisation et la déprotéinisation. Les objectifs ont porté sur :

- La mise en œuvre du procédé. Pour favoriser cette protéolyse, la concentration en acide apporté au milieu doit être en équilibre avec le carbonate de calcium du substrat, conduisant à une stabilisation du pH par effet tampon.
- La mise en œuvre de la stratégie analytique. Pour comparer les performances du procédé, il est important de qualifier le substrat initial et les produits de l'hydrolyse enzymatique. Une analyse complète de leur composition est alors nécessaire. L'un des objectifs a donc été de comparer et de discuter de la pertinence des méthodes de caractérisation desdits produits.
- L'optimisation du procédé a ensuite été conduite en étudiant l'impact de plusieurs facteurs au cœur de cinétiques : la taille des fragments de substrat, la température et la concentration en enzyme.
- Enfin le positionnement du procédé a été établi par rapport aux procédés existants et l'identification des composés solubles libérés par l'hydrolyse enzymatique a été initiée.

Principal obstacle rencontré

Les coproduits de crevettes sont caractérisés par un réseau dense de protéines et de chitine qui interagissent avec les minéraux pour former l'exosquelette. Par ailleurs, les composés impliqués sont généralement des complexes caroténo-protéiques et gluco-protéiques. Les liaisons covalentes mises en jeu s'opposent alors à la séparation de ces composés. Elle s'avère délicate et généralement incomplète ou excessive. Or la majorité des méthodes d'analyse de composition reposent sur une séparation préalable de ces derniers.

Les bilans de masse, appliqués aux substrats comme aux produits des hydrolyses, ont mis en évidence cette difficulté analytique. Remédier à cette problématique a donc constitué un point important de ce travail de thèse.

La méthode retenue consiste, dans un premier temps, à estimer la quantité de protéines par le dosage des acides aminés totaux. Par rapport aux autres méthodes, cette technique n'exige pas de séparation préalable de la chitine et des protéines. Puis, la quantité de chitine est estimée. La technique sélectionnée repose sur le nettoyage chimique des produits. Une seconde méthode consiste à utiliser les bilans massiques. L'analyse élémentaire et l'analyse thermogravimétrique s'ajoutent aux précédentes méthodes pour recouper et valider ou corriger l'estimation de la teneur en chitine.

De manière générale, plus le degré de pureté en chitine augmentait, plus les résultats obtenus par les différentes méthodes convergeaient. Une seule méthode ne suffit donc pas à

déterminer la quantité de chitine. Pourtant, c'est une pratique courante qui se traduit par des différences de teneurs décrites dans la littérature, y compris pour une même espèce biologique. Certains auteurs font le choix de ne présenter qu'une seule catégorie de composés incluant la chitine et les protéines. Pour notre étude, cette distinction est nécessaire. Il s'avère donc important d'appliquer un recoupement d'au moins deux méthodes distinctes

Principaux facteurs pour améliorer les performances du procédé

Un effort important a été apporté à l'étude des facteurs ayant un impact sur les cinétiques de déminéralisation et de déprotéinisation.

La taille initiale des fragments de substrat s'est révélée être le facteur déterminant sur les deux cinétiques. Les vitesses de déminéralisation et de déprotéinisation sont augmentées par une réduction de la taille des fragments. La surface de contact offerte aux enzymes croît à mesure que la taille des fragments est réduite. Ce paramètre permet donc d'optimiser la purification de la chitine tout en réduisant le temps du traitement.

Nos observations ont montré que les cinétiques obtenues ne répondent pas à des relations exponentielles simples. Un effort de modélisation a permis de proposer une formalisation des deux cinétiques. Le modèle exprime la vitesse de déminéralisation à l'aide d'une fonction polynomiale des facteurs environnementaux, multipliée par une fonction linéaire de la quantité des minéraux résiduels. Par conséquent, la vitesse de déminéralisation est d'autant plus rapide que la quantité de minéraux est importante.

Les meilleurs modèles de déprotéinisation ont fait intervenir des fonctions sigmoïdes. Elles expriment l'influence probable de phénomènes d'allostérie, c'est-à-dire d'inhibition de la réaction par la fraction protéique.

Par rapport à la taille des fragments, la température et de la concentration en enzyme ont un impact plus faible. L'augmentation de la température favorise la solubilisation des minéraux alors qu'augmenter la concentration d'enzyme favorise la solubilisation des protéines.

Extension vers de nouvelles enzymes et d'autres conditions opératoires

L'optimisation du procédé a permis d'obtenir une pureté en chitine intéressante : la quantité de minéraux résiduels est très faible, de l'ordre de 1 %. Celle des protéines résiduelles est plus élevée, de l'ordre de 10 %. Le rendement en chitine est de l'ordre de 28 % par rapport au poids initial de matière première. Ces performances sont satisfaisantes au regard des autres procédés biologiques, pour lesquels les teneurs en impuretés sont généralement plus élevées et les durées de traitement plus longues. En revanche, le procédé chimique permet d'obtenir une pureté en chitine plus élevée. Les caractéristiques physico-chimiques de la chitine obtenue par voie enzymatique et chimique ne présentent pas de différences significatives.

Ces protéolyses acides ont été conduites par la pepsine, dans un milieu maintenu à pH 2 par l'acide phosphorique. Nous avons exploré l'emploi d'un nouveau couple enzyme/acide, à savoir l'ASP et l'acide formique. Les premiers résultats présentés dans cette thèse s'avèrent

prometteurs. Par conséquent, nous pouvons supposer qu'une étude orientée vers le potentiel de ce couple puisse augmenter les performances du procédé.

Enfin, ce procédé biologique présente un potentiel accru en raison d'une valorisation de la phase soluble. Ce point a également été exploré dans ce manuscrit.

Principales perspectives

Ce procédé peut être étendu à d'autres couples d'enzyme et d'acide. De plus, il pourrait être appliqué à d'autres substrats tels que les céphalopodes (seiches et calamars), dont la chitine est de nature différente, à d'autres crustacés (comme les crabes et les écrevisses), et aux insectes.

De part la multiplicité des méthodes, nous disposons d'un nombre important de données cinétiques. Il serait probablement enrichissant d'approfondir l'exploitation de leur recoupement par l'emploi de la théorie de réconciliation des données dynamiques. Une telle approche devrait alors contribuer à affiner simultanément la précision des mesures et des modèles proposés.

En dernier lieu, une étude économique approfondie permettrait de comparer la rentabilité de ce procédé par rapport à l'extraction chimique traditionnelle.

Valorisations scientifiques associées à cette étude

- Brevet

« Extraction de chitines en une seule étape par hydrolyse enzymatique en milieu acide », 24 mai 2011, FR 11 54580

- Communication orales

Le Roux K., Arhaliass A., Baron R., Bergé J.P., Leroy E., « Chitin extraction from marine by-products by enzymatic hydrolysis », 2009, Colloque Polymerix

- Communication orales avec actes de publication

Le Roux K., Bergé J.P., Arhaliass A., Baron R., « New enzymatic extracction of chitin from crustacean by-product », 2011, 9th Asian Pacific Chitin & Chitosan Symposium.

- Posters

« Application de l'hydrolyse enzymatique pour l'extraction de la chitine », 2010, Doctoriales

Le Roux K., Arhaliass A., Baron R., Bergé J.P., Leroy E., 2009, « Application de l'hydrolyse enzymatique pour le traitement des coproduits marins. Exemple des protéases pour l'extraction de la chitine », Colloque Gen2Bio

Références

- Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VGH: **Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine.** *Mar Drugs*, **2010**, 8(5):1482-1517.
- Abdou E, Nagy K, Elsabee M: **Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources.** *Bioresour Technol*, **2008**, 99(5):1359-1367
- Aggarwal P, Dollimore D: **The effect of chemical modification on starch studied using thermal analysis.** *Thermochim Acta*, **1998**, 324(1-2):1-8
- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM: **Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.** *J Control Release*, **2004**, 100(1):5-28
- Adams RF: **Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography.** *J Chromatogr*, **1974**, 95(2):189-212
- Allan CR, Hadwiger LA: **Fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell-wall composition.** *Exp Mycol*, **1979**, 3(3):285-287.
- Alonso IG, Vega DO: **Thermoanalytical studies on lobster shell. 2. Quantitative-analysis.** *J Therm Anal Calorim*, **1990**, 36(4):1347-1354
- Al Sagheer FA, Al-Sughayer MA, Muslim S, Elsabee MZ: **Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf.** *Carbohydr Polym*, **2009**, 77(2):410-419
- Al-Sawalmih A, Li C, Siegel S, Fabritius H, Yi S, Raabe D, Fratzl P, Paris O: **Microtexture and Chitin/Calcite Orientation Relationship in the Mineralized Exoskeleton of the American Lobster.** *Adv Funct Mater*, **2008**, 18(20):3307-3314
- Amorim JA, Eliziário SA, Gouveia DS, Simões ASM, Santos JCO, Conceição MM, Souza AG, Trindade MFS: **Thermal analysis of the rice and by-products.** *J of Thermal Analysis and Calorimetry*, **2004**, 75(2):393-399
- Andrieux G: **La filière française des coproduits de la pêche et de l'aquaculture.** In: *Rapport scientifique du projet Gestion Durable*. OFIMER; **2004**
- A.O.A.C.: **Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists**, Association of Official Analytical Chemists, **1980**, Washington: DC.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A: **Functional characterization of chitin and chitosan.** *Current Chemical Biology*, **2009**, 3(2):203-230
- Arguelles-Monal WM, Goycoolea FM, Peniche C, Lizardi J, Higuera-Ciapara I: **Phase separation and gelation processes in alkali chitin.** *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **2000**, 219:U402-U402
- Armenta RE, Guerrero-Legarreta I: **Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins.** *Food Chem*, **2009**, 112(2):310-315
- Atkins WM: **Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions.** In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. vol. 45. Palo Alto: Annual Reviews; **2005**: 291-310
- Aurioles-Gamboa D, Castro-Gonzalez MI, Romo FPG, Barita JLS: **Quality differences in feeding areas of the red crab, Pleuroncodes planipes stimpson, as reflected from their lipid, fatty acids,**

and astaxanthin composition. *Crustaceana*, **2004**, 77:163-176

Babu CM, Chakrabarti R, Surya Sambasivarao KR: **Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids.** *LWT-Food Sci Technol*, **2008**, 41(2):227-235

Bajaj M, Winter J, Gallert C: **Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste.** *Biochem Eng J*, **2011**, 56(1-2):51-62

Bansal P, Hall M, Realf MJ, Lee JH, Bommarius AS: **Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates.** *Biotechnol Adv*, **2009**, 27(6):833-84

Barret, Rawlings, Woessner : **Handbook of proteolytic enzymes, 1998** : Academic Press

Beaney P, Lizardi-Mendoza J, Healy M: **Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods.** *J Chem Tech Biotechnol*, **2005**, 80(2):145-150

Beaulieu L, Thibodeau J, Bryl P, Carbonneau MÉ: **Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules.** *Bioresour Technol*, **2009**, 100(13):3332-3342

Bergé JP, Barnathan G: **Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects.** In: *Marine Biotechnology I*. Edited by Gal YL, Ulber R, vol. 96. Berlin: Springer-Verlag Berlin; **2005**: 49-125

Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R: **Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.** *Eur J Pharm Biopharm*, **2004**, 57(1):19-34

Berth G, Dautzenberg H: **The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution.** *Carbohydr Polym*, **2002**, 47(1):39-51

Berthold A, Cremer K, Kreuter J: **Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs.** *Journal of Controlled Release*, **1996**, 39(1):17-25

Bhaskar N, Suresh PV, Sakhare PZ, Sachindra NM: **Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery.** *Enzyme Microb Technol*, **2007**, 40(5):1427-1434

Black MM, Schwartz HM: **The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products.** *Analyst*, **1950**, 75(889):185-189

Bornet A, Teissedre PL: **Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines.** *Eur Food Res Technol*, **2008**, 226(4):681-689

Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ: **Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways.** *Angew Chem-Int Edit* **2004**, 43(45):6032-6040

Bouchon S: **Chitine, chitosan et dérivés : intérêt pharmaceutique et cosmétique.** Université de Nantes, Faculté de Pharmacie; **1995**

- Bouglé D: **Peptides fonctionnels marins**. *Phytothérapie*, **2007**, 5(1):22-26
- Bouligand Y: **Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases**. *Tissue and Cell*, **1972**, 4(2):189-217
- Bradford MM: **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72(1-2):248-254
- Brinchmann BC, Bayat M, Brogger T, Muttuvelu DV, Tjonneland A, Sigsgaard T: **A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy**. *Ann Agr Env Med*, **2011**, 18(1):7-12
- Burstein C: **biotechnologie enzymatique. Mode D'emploi, Industrie Alimentaire, Environnement, Médical**: Broché; **2000** ; p110
- Bueno-Solano C, Lopez-Cervantes J, Campas-Baypoli ON, Lauterio-Garcia R, Adan-Bante NP, Sanchez-Machado DI: **Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products**. *Food Chem*, **2009**, 112(3):671-675
- Cabrera JC, Van Cutsem P: **Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan**. *Biochem Eng J*, **2005**, 25(2):165-172
- Cai J, Yang J, Du Y, Fan L, Qiu Y, Li J, Kennedy JF: **Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant**. *Carbohydr Polym*, **2006**, 64(2):151-157
- Camci-Unal G, Pohl NLB: **Thermodynamics of binding interactions between divalent copper and chitin fragments by isothermal titration calorimetry (ITC)**. *Carbohydr Polym*, **2010**, 81(1):8-13
- Cárdenas G, Orlando P, Edelio T: **Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent**. *Int J Biol Macromol*, **2001**, 28(2):167-174
- Cárdenas G, Miranda SP: **FTIR and TGA studies of chitosan composite films**. *J Chil Chem Soc*, **2004**, 49(4):291-295
- Cárdenas G, Díaz J, Meléndrez MF, Cruzat C: **Physicochemical properties of edible films from chitosan composites obtained by microwave heating**. *Polym Bull*, **2008**, 61(6):737-748
- Cauchie H-M: **Chitin production by arthropods in the hydrosphere**. *Hydrobiologia*, **2002**, 470(1):63-95.
- CCM-International: **Benchmarking on Chitin Production in China** China Chemicals Market International Limited ; **2009**: 44.
- Chakrabarti R: **Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process**. *Food Biotechnology*, **2002**, 16(1):81-90
- Chang KLB, Tsai G, Lee J, Fu WR: **Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution**. *Carbohydr Res*, **1997**, 303(3):327-332
- Chantereau P: **Traitement des crevettes contre le noircissement: Mise au point d'une ligne de traitement**. In.: Archimer; **1991**: 16.
- Charoenvuttitham P, Shi J, Mittal GS: **Chitin extraction from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) waste using organic acids**. *Sep Sci Technol*, **2006**, 41(6):1135-1153

Chatterjee S, Chatterjee BP, Guha AK: **Clarification of fruit juice with chitosan.** *Process Biochem*, **2004**, 39(12):2229-2232

Chen GC, Johnson BR: **Improved colorimetric determination of cell-wall chitin in wood decay fungi.** *Applied and Environmental Microbiology*, **1983**, 46(1):13-16

Chen RH, Chang JR, Shyur JS: **Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan.** *Carbohydr Res*, **1997**, 299(4):287-294

Chen CS, Liao WY, Tsai GJ: **Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation.** *J Food Prot*, **1998**, 61(9):1124-1128.

Cho YW, Jang J, Park CR, Ko SW: **Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins.** *Biomacromolecules*, **2000**, 1(4):609-614

Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JCG, Lin JG: **Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall.** *Acta Pharmacol Sin*, **2004**, 25(7):932-936.

Cooper JB, Khan G, Taylor G, Tickle IJ, Blundell TL: **X-ray analyses of aspartic proteinases: II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3Å resolution.** *Journal of Molecular Biology*, **1990**, 214(1):199-222

Crini G, Badot PM, Guibal E: **Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application:** Presses universitaires de Franche-Comté; **2009**

Crooke WM, Simpson WE: **Determination of ammonium in Kjeldhal digests crops by an automated procedure** *J Sci Food Agric* **1971**, 27:1256-1262

Cros S, Lignot B, Razafintsalama C, Jaouen P, Bourseau P: **Electrodialysis desalination and reverse osmosis concentration of an industrial mussel cooking juice: Process impact on pollution reduction and on aroma quality.** *J Food Sci*, **2004**, 69(6):C435-C442

De Alvarenga ES, de Oliveira CP, Bellato CR: **An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan.** *Carbohydr Polym*, **2010**, 80(4):1155-1160

De Holanda HD, Netto FM: **Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis.** *J Food Sci*, **2006**, 71(5):C298-C303

De Jin R, Suh JW, Park RD, Kim YW, Krishnan HB, Kim KY: **Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** *Nematology*, **2005**, 7:125-132

De Moura MR, Aouada FA, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC: **Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles.** *J Food Eng*, **2009**, 92(4):448-453

Destoumieux D, Bulet P, Loew D, VanDorsselaer A, Rodriguez J, Bachere E: **Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda).** *J Biol Chem*, **1997**, 272(45):28398-28406

Destoumieux D: **Peptides anti-microbiens de crustacés, dénommés penaeidines.** INPI. Edited by IFREMER, WO 9801583. FRANCE; **2000(a)**

- Destoumieux D, Munoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, Comps M, Bachere E: **Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge.** *J Cell Sci*, **2000(b)**, 113(3):461-469
- Destoumieux D, Munoz M, Bulet P, Bachère E: **Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda).** *Cell Mol Life Sci*, **2000**, 57(8):1260-1271
- Dev A, Binulal NS, Anitha A, Nair SV, Furuike T, Tamura H, Jayakumar R: **Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications.** *Carbohydr Polym*, **2010**, 80(3):833-838
- Diaz-Rojas EI, Arguelles-Monal WM, Higuera-Ciapara I, Hernandez J, Lizardi-Mendoza J, Goycoolea FM: **Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste.** *Macromol Biosci*, **2006**, 6(5):340-347
- Di Mario F, Rapana P, Tomati U, Galli E: **Chitin and chitosan from Basidiomycetes.** *Int J Biol Macromol*, **2008**, 43(1):8-12
- Dong YM, Xu CY, Wang JW, Wu YS, Wang M, Ruan YH: **Influence of degree of deacetylation on critical concentration of chitosan/dichloroacetic acid liquid-crystalline solution.** *J Appl Polym Sci*, **2002**, 83(6):1204-1208
- Dornenburg H, Knorr D: **Elicitation of chitinases and anthraquinones in morinda-citrifolia cell-cultures.** *Food Biotechnology*, **1994**, 8(1):57-65
- Dorozhkin SV: **Calcium orthophosphates.** *J Mater Sci*, **2007**, 42(4):1061-1095
- Du YJ, Zhao YQ, Dai SC, Yang B: **Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity.** *Innov Food Sci Emerg Technol*, **2009**, 10(1):103-107
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.** *Anal Chem*, **1956**, 28(3):350-356
- Duarte ML, Ferreira MC, Marvao MR, Rocha J: **An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy.** *Int J Biol Macromol* **2002**, 31(1-3):1-8
- Dumay J: **Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*).** Université de Nantes, **2006**, p325
- Einbu A: **Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis.** Trondheim, Norwegian University of Science and Technology; **2007(a)**
- Einbu A, Grasdalen H, Varum KM: **Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid.** *Carbohydr Res*, **2007(b)**, 342(8):1055-1062
- Einbu A, Varum KM: **Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid.** *Biomacromolecules*, **2007**, 8(1):309-314
- Einbu A, Varum KM: **Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN.** *Biomacromolecules*, **2008**, 9(7):1870-1875
- Ehrlich H, Maldonado M, Spindler KD, Eckert C, Hanke T, Born R, Goebel C, Simon P, Heinemann S, Worch H: **First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part**

I. Verongidae (Demospongia : porifera). *Journal of experimental zoology part B - Molecular and developmental*, **2007**, 308B(4):347-356.

Esaiassen M, Myrnes B, Olsen RL: **Isolation and substrate specificities of five chitinases from the Hepatopancreas of Northern shrimp, *Pandalus borealis*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **1996**, 113(4):717-723

Fabritius H-O, Sachs C, Triguero PR, Raabe D: **Influence of Structural Principles on the Mechanics of a Biological Fiber-Based Composite Material with Hierarchical Organization: The Exoskeleton of the Lobster *Homarus americanus*.** *Advanced Materials*, **2009**, 21(4):391-400

Fall PA: **Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale, 2011,** Université de Nantes

FAO: **Production mondiale - Ratio pêche/aquaculture : exemple des crevettes, 2006**
[<http://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Stats-crustaces/Production-mondiale>]

FAO: **Global study of shrimp fisheries.** In: *Fisheries Technical Paper*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United States; **2008**: 359

FAO: **SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture,** In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; **2008**: 196

FAO: **SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture.** In. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; **2010**: 218

FAO: **Production des pénéides - Répartition de la production aquacole mondiale, 2010**
[<http://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Stats-crustaces/Production-des-peneides>]

Fischer TH, Connolly R, Thatte HS, Schwaitzberg SS: **Comparison of structural and hemostatic properties of the poly-N-acetyl glucosamine Syvek Patch with products containing chitosan.** *Microsc Res Tech*, **2004**, 63(3):168-174

Fleury Y, Defer D, Bourgougnon N: **Antimicrobiale peptides and antiviral activities from marine fished or farmed animals.** In: *Added Value to Fisheries Waste. Transworld Research Network - Indian publisher: Bergé, J.P. Ed; 2008*: 163-196

Flory PJ, Fox TG: **Molecular configuration and thermodynamic parameters from intrinsic viscosities.** *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **1996**, 34(2):207-209

Focher B, Beltrame PL, Naggi A, Torri G: **Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications.** *Carbohydr Polym*, **1990**, 12(4):405-418

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *The Journal of biological chemistry*, **1957**, 226(1):497-509

Franca EF, Lins RD, Freitas LCG, Straatsma TP: **Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution.** *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2008**, 4(12):2141-2149

France Chitine : **Fabrication des chitosans. Fabrication de la chitine et de ses dérivés**
[<http://www.france-chitine.com/fab.html>]

Fruton JS, Fujii S, Knappenberger MH: **The mechanism of pepsin action.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1961**, 47:759-76

- Furuhashi T, Beran A, Blazso M, Czegeny Z, Schwarzinger C, Steiner G: **Pyrolysis GC/MS and IR Spectroscopy in Chitin Analysis of Molluscan Shells**. *Biosci Biotechnol Biochem*, **2009**, 73(1):93-103
- Gagne N, Simpson BK: **Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes**. *Food Biotechnology*, **1993**, 7:253-263
- Galed G, Miralles B, Paños I, Santiago A, Heras Á: **N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin**. *Carbohydr Polym*, **2005**, 62(4):316-320
- Gartner C, Pelaez CA, Lopez BL: **Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods**. *E-Polymers*, **2010**, 069
- GIA: **CHITINE ET CHITOSAN. Un Rapport De Gestion Stratégique Global**. *Global Industry Analysts; MCP-2039*, **2010**: 230.
- Gildberg A, Stenberg E: **A new process for advanced utilisation of shrimp waste**. *Process Biochem*, **2001**, 36(8-9):809-812
- Giraud-Guille MM: **Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle**. *Tissue and Cell*, **1984**, 16(1):75-92
- Giraud-Guille MM, Belamie E, Mosser G: **Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials**. *Comptes Rendus Palevol*, **2004**, 3(6-7):503-513
- Gizatulina GA, Chebotok EN, Novikov VY, Konovalova IN: **Kinetics of Acid Hydrolysis of Acetylglucosamine**. *Russian Journal of Applied Chemistry*, **2005**, 78(5):791-793
- GLOBEFISH: **Shrimp - August 2011** [<http://www.globefish.org/shrimp-august-2011.html>]
- Gnaiger E, Bitterlich G: **Proximate Biochemical - Composition and Caloric Content Calculated From Elemental CHN Analysis - A stoichiometric concept**. *Oecologia* **1984**, 62(3):289-298
- Gomez Ramirez M, Rojas Avelizapa LI, Rojas Avelizapa NG, Cruz Camarillo R: **Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases**. *Journal of microbiological methods*, **2004**, 56(2):213-219
- Goycoolea FM, Arguelles-Monal W, Peniche C, Higuera-Ciajara I: **Effect of chitosan on the gelation of kappa-carrageenan under various salt conditions**. Amsterdam: Elsevier Science Bv; **1999**
- González López CV, García MCC, Fernández FGA, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JMF: **Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass**. *Bioresour Technol*, **2010**
- Gornall AG, Bardawill CS, David MN: **Determination of serum protein by means of the Biuret reaction**. *Journal Biolological Chemistry*, **1949**, 177:751-756
- Grzyb J, Latowski D, Strzałka K: **Lipocalins – a family portrait**. *Journal of Plant Physiology*, **2006**, 163(9):895-915
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M: **Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition**. *Trends Biotechnol*, **2003**, 21(5):210-216

- Guibal E, Roussy J, LeCloirec P: **Photochemical reaction of uranium with glucosamine, acetylglucosamine and related polymers: Chitin and chitosan.** *Water SA*, **1996**, 22(1):19-26
- Guibal E, Vincent T, Roussy J: **Interaction of chitosan with metal ions: from environmental applications to the elaboration of new materials.** In: *Biohydrometallurgy: A Meeting Point between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation*. Edited by Donati ER, Viera MR, Tavani EL, Giaveno MA, Lavallo TL, Chiacchiarini PA, vol. 71-73. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd; **2009**: 519-526
- Gimeno M, Ramírez-Hernández JY, Martínez-Ibarra C, Pacheco N, García-Arazola R, Bárzana E, Shirai K: **One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes.** *J Agric Food Chem*, **2007**, 55(25):10345-10350
- Gupta NS, Briggs DEG, Landman NH, Tanabe K, Summons RE: **Molecular structure of organic components in cephalopods: Evidence for oxidative cross linking in fossil marine invertebrates.** *Organic Geochemistry*, **2008**, 39(10):1405-1414
- Hackman RH, Goldberg M: **The non-covalent binding of two insect cuticular proteins by a chitin.** *Insect Biochemistry*, **1978**, 8(5):353-357
- Hamodrakas SJ, Willis JH, Iconomidou VA: **A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins.** *Insect biochemistry and molecular biology*, **2002**, 32(11):1577-1583
- Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, Sato M: **Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria.** *Arch Oral Biol*, **2007**, 52(3):290-294
- Healy M, Green A, Healy A: **Bioprocessing of marine crustacean shell waste.** *Acta Biotechnol*, **2003**, 23(2-3):151-160
- Hein S, Ng CH, Stevens WF, Wang K: **Selection of a practical assay for the determination of the entire range of acetyl content in chitin and chitosan: UV spectrophotometry with phosphoric acid as solvent.** *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2008**, 86B(2):558-568
- Helgason T, Gislason J, McClements DJ, Kristbergsson K, Weiss J: **Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interfaces in an in vitro digestion model.** *Food hydrocolloids*, **2009**, 23(8):2243-2253
- Herth W, Barthlott W: **Site of Beta-Chitin Fibril Formation in Centric Diatoms. 1.Pores and Fibril Formation.** *Journal of Ultrastructure Research* **1979**, 68(1):6-15
- Hirano S, Horiuchi K: **Chitin gels.** *Int J Biol Macromol* **1989**, 11(4):253-254.
- Holan Z, Votruba J, Vlasakova V: **New method of chitin determination based on deacetylation and Gas-Liquid-Chromatographic Assay of liberated acetic acid.** *Journal of Chromatography*, **1980**, 190(1):67-76
- Holme HK, Foros H, Pettersen H, Dornish M, Smidsrod O: **Thermal depolymerization of chitosan chloride.** *Carbohydr Polym*, **2001**, 46(3):287-294
- Hosseini SA, Shah N: **Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model.** *Biomass Bioenerg*, **2011**, 35(9):3830-3840
- Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ: **The effect of chitin and**

chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, **2001**, 22(22):2959-2966.

Hsiao HY, Tsai CC, Chen SM, Hsieh BC, Chen RLC: **Spectrophotometric determination of deacetylation degree of chitinous materials dissolved in phosphoric acid.** *Macromol Biosci*, **2004**, 4(10):919-921

Hsien TY, Rorrer GL: **Effects of acylation and cross-linking on the material properties and Cadmium ion adsorption capacity of porous chitosan beads.** *Sep Sci Technol*, **1995**, 30(12):2455-2475

Iconomidou VA, Willis JH, Hamodrakas SJ: **Is beta-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle?** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **1999**, 29(3):285-292

IFREMER, **La farine de poisson et autres produits d'origine aquatique, 2008**,
[<http://aquaculture.ifremer.fr/Fiches-d-information/Filiere-Poissons/La-farine-de-poisson-et-autres-produits-d-origine-aquatique>]

Ilankovan P, Hein S, Ng CH, Trung TS, Stevens WF: **Production of N-acetyl chitobiose from various chitin substrates using commercial enzymes.** *Carbohydr Polym*, **2006**, 63(2):245-250

Inoue H, Ohira T, Ozaki N, Nagasawa H: **A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii*.** *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, 318(3):649-654

Ito M, Ban A, Ishihara M: **Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats.** *Japanese Journal of Pharmacology*, **2000**, 82(3):218-225

Jaworska M, Sakurai K, Gaudon P, Guibal E: **Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties.** *Polymer International*, **2003**, 52(2):198-205

Jaworska MM, Konieczna E: **The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*.** *Appl Microbiol Biotechnol*, **2001**, 56(1-2):220-224

Jayakumar R, Prabakaran M, Kumar PTS, Nair SV, Tamura H: **Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications.** *Biotechnol Adv*, **2011**, 29(3):322-337

Je JY, Park PJ, Kim SK: **Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy.** *Food Chem Toxicol*, **2004**, 42(3):381-387

Jeon Y-J, Kim S-K: **Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity.** *Carbohydr Polym*, **2000**, 41(2):133-141

Jeon YJ, Kamil J, Shahidi F: **Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod.** *J Agric Food Chem*, **2002**, 50(18):5167-5178

Jeuniaux C, Vossfoucart MF: **Chitin biomass and production in the marine-environment.** *Biochemical Systematics and Ecology*, **1991**, 19(5):347-356

Jiang HL, Kim TH, Kim YK, Park IY, Cho MH, Cho CS: **Efficient gene delivery using chitosan-polyethylenimine hybrid systems.** *Biomed Mater*, **2008**, 3(2)

Jun HK, Kim JS, No HK, Meyers SP: **Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu waste-water.** *J Agric Food Chem*, **1994**, 42(8):1834-1838

Jung WK, Moon SH, Kim SK: **Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats.** *Life Sci*, **2006**, 78(9):970-976

Jung WJ, Souleimanov A, Park RD, Smith DL: **Enzymatic production of N-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from Paenibacillus illioisensis KJA-424.** *Carbohydr Polym*, **2007**, 67(2):256-259

Kasaai MR, Arul J, Charlet C: **Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan.** *J Polym Sci Pt B-Polym Phys*, **2000**, 38(19):2591-2598

Kasaai MR: **Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data.** *Carbohydr Polym*, **2007**, 68(3):477-488

Kasaai MR: **Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review.** *J Agric Food Chem*, **2009**, 57(5):1667-1676

Kadokawa J-i, Takegawa A, Mine S, Prasad K: **Preparation of chitin nanowhiskers using an ionic liquid and their composite materials with poly(vinyl alcohol).** *Carbohydr Polym*, **2011**, 84(4):1408-1412

Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriotis V: **Bioconversion of Chitin to Chitosan - Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, 90(7):2564-2568

Kamerling JP, Gerwig GJ, Vliegenthart JFG, Clamp JR: **Characterization by Gas-Liquid Chromatography Mass and Proton-Magnetic-Resonance Spectroscopy of Pertrimethylsilylmethyl glycosides obtained in glycoproteins and glycopeptides.** *Biochem J*, **1975**, 151(3):491-495

Khan W, Prithiviraj B, Smith DL: **Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves.** *Journal of Plant Physiology*, **2003**, 160(8):859-863

Khanafari A, Marandi R, Sanatei S: **Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods.** *Iran J Environ Health Sci Eng*, **2008**, 5(1):19-24

Khoushab F, Yamabhai M: **Chitin Research Revisited.** *Mar Drugs*, **2010**, 8(7):1988-2012

Kim SK, Park PJ, Jung WK, Byun HG, Mendis E, Cho YI: **Inhibitory activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the formation of calcium phosphate.** *Carbohydr Polym*, **2005**, 60(4):483-487

Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC: **Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.).** *J Agric Food Chem*, **2005**, 53(9):3696-3701

Kim KW, Thomas RL: **Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights.** *Food Chem*, **2007**, 101(1):308-313

Kim S-K: **Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications:** CRC Press; **2010**

Kim S-K: **Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine - Biocompatibility and allergy.** In: *Advances in Food and Nutrition Research Volume 65 Marine*

- Medicinal Foods: Implications and Applications - Animals and Microbes*. Edited by Kim S-K: Elsevier; **2012**: 523 pages (114-115)
- Kittur FS, Kumar ABV, Varadaraj MC, Tharanathan RN: **Chitooligosaccharides - preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity**. *Carbohydr Res*, **2005**, 340(6):1239-1245
- Kjartansson GT, Zivanovic S, Kristbergsson K, Weiss J: **Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*)**. *J Agric Food Chem*, **2006(a)**, 54(9):3317-3323
- Kjartansson GT, Zivanovic S, Kristbergsson K, Weiss J: **Sonication-Assisted Extraction of Chitin from North Atlantic Shrimps (*Pandalus borealis*)**. *J Agric Food Chem*, **2006(b)**, 54(16):5894-5902
- Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW: **Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro**. *J Periodont*, **1996**, 67(11):1170-117
- Komath M, Varma HK: **Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications**. *Bulletin of Materials Science*, **2003**, 26(4):415-422
- Kono H: **Two-dimensional magic angle spinning NMR investigation of naturally occurring chitins: Precise H-1 and C-13 resonance assignment of alpha- and beta-chitin**. *Biopolymers*, **2004**, 75(3):255-263
- Koshland DE, Jr.: **Molecular basis of enzyme catalysis and control**. *Pure and applied chemistry Chimie pure et appliquee*, **1971**, 25(1):119-13
- Krajewska B: **Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review**. *Enzyme Microb Technol*, **2004**, 35(2-3):126-139
- Kumar M, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ: **Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives**. *Chem Rev*, **2004**, 104(12):6017-6084
- Kumar M, Hellermann G, Lockey RF, Mohapatra SS: **Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art**. *Expert Opin Biol Ther*, **2004**, 4(8):1213-1224.
- Kumar ABV, Tharanathan RN: **A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes**. *Carbohydr Polym*, **2004**, 58(3):275-283
- Kumar ABV, Varadara MC, Gowda LR, Tharanathan RN: **Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanlysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli***. *Biochem J*, **2005**, 391:167-175
- Kumirska J, Weinhold MX, Sauvageau JCM, Thoming J, Kaczynski Z, Stepnowski P: **Determination of the pattern of acetylation of low-molecular-weight chitosan used in biomedical applications**. *J Pharm Biomed Anal*, **2009**, 50(4):587-590
- Kumirska J, Czerwicka M, Kaczynski Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thoming J, Stepnowski P: **Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan**. *Mar Drugs*, **2010**, 8(5):1567-1636
- Kurita K: **Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans**. *Mar Biotechnol*, **2006**, 8(3):203-226
- Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG: **Chitosan supports the expression of**

extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res*, **2000**, 51(4):586-595

Lamarque G, Viton C, Domard A: **Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of alpha- and beta-chitins in a multistep process.** *Biomacromolecules*, **2004**, 5(5):1899-1907

Langer RC, Vinetz JM: **Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix.** *Trends Parasitol*, **2001**, 17(6):269-272

Lavall RL, Assis OBG, Campana SP: **beta-Chitin from the pens of Loligo sp.: Extraction and characterization.** *Bioresour Technol*, **2007**, 98(13):2465-2472

Lavertu M, Xia Z, Serreqi AN, Berrada M, Rodrigues A, Wang D, Buschmann MD, Gupta A: **A validated H-1 NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan.** *J Pharm Biomed Anal*, **2003**, 32(6):1149-1158

Le Roux K, Bergé J-P, Baron R, Abdellah A: **Extraction de chitines en une seule étape par hydrolyse enzymatique en milieu acide,** *INPI. IFREMER, CNRS. France: FR 11 54580; 2011: 26*

Lee DX, Xia WS, Zhang JL: **Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase.** *Food Chem*, **2008**, 111(2):291-295

Li J, Du YM, Yang JH, Feng T, Li AH, Chen P: **Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme.** *Polym Degrad Stabil*, **2005**, 87(3):441-448

Liao FH, Shieh MJ, Chang NC, Chien YW: **Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients.** *Nutrition Research*, **2007**, 27(3):146-151

Lin SB, Chen SH, Peng KC: **Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of beta-chitosan in a Trichoderma harzianum chitinase-hydrolysing process.** *J Sci Food Agric*, **2009**, 89(2):238-244

Lopata AL, O'Hehir RE, Lehrer SB: **Shellfish allergy.** *Clinical & Experimental Allergy*, **2010**, 40(6):850-858

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *The Journal of biological chemistry*, **1951**, 193(1):265-275

Lu LM, Zhang L, Zhang XB, Wu ZS, Huan SY, Shen GL, Yu RQ: **A MgO Nanoparticles Composite Matrix-Based Electrochemical Biosensor for Hydrogen Peroxide with High Sensitivity.** *Electroanalysis*, **2010**, 22(4):471-477

MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang JJ, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP: **Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery.** *Journal of Controlled Release*, **1998**, 56(1-3):259-272

Maity JP, Lin TJ, Cheng HPH, Chen CY, Reddy AS, Atla SB, Chang YF, Chen HR, Chen CC: **Synthesis of Brushite Particles in Reverse Microemulsions of the Biosurfactant Surfactin.** *Int J Mol Sci*, **2011**, 12(6):3821-3830

Marcilla A, Gómez-Siurana A, Gomis C, Chápuli E, Catalá MC, Valdés FJ: **Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: Application to nannochloropsis sp.**

Thermochimica Acta, **2009**, 484(1-2):41-47

Marquis-Duval F-O: **Isolation et Valorisation des Constituants de la Carapace de Crevettes nordique**. Québec: Université de Laval; **2008**

Mathur NK, Narang CK: **Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals**. *Journal of chemical education*, **1990**, 67(11):938

Manni L, Ghorbel-Bellaaj O, Jellouli K, Younes I, Nasri M: **Extraction and Characterization of Chitin, Chitosan, and Protein Hydrolysates Prepared from Shrimp Waste by Treatment with Crude Protease from Bacillus cereus SV1**. *Appl Biochem Biotechnol*, **2010**, 162(2):345-357

Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V: **Chitin Deacetylation by Enzymatic Means - Monitoring of Deacetylation process**. *Carbohydr Res*, **1995**, 273(2):235-242

Martinou A, Bouriotis V, Stokke BT, Varum KM: **Mode of action of chitin deacetylase from Mucor rouxii on partiality N-acetylated chitosans**. *Carbohydr Res*, **1998**, 311(1-2):71-78

Miao YQ, Tan SN: **Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde**. *Analyst*, **2000**, 125(9):1591-1594

Millamena O, Bautista MN, Reyes OS, Kanazawa A: **Threonine requirement of juvenile marine shrimp Penaeus monodon**. *Aquaculture*, **1997**, 151(1-4):9-14

Min B-M, Lee SW, Lim JN, You Y, Lee TS, Kang PH, Park WH: **Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers**. *Polymer*, **2004**, 45(21):7137-7142

Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y: **Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing**. *Carbohydr Polym* **2007**, 67(4):640-644

Minke R, Blackwell J: **Structure of alpha-chitin**. *J Mol Biol*, **1978**, 120(2):167-181

Mizani M, Aminlari M, Khodabandeh M: **An effective method for producing a nutritive protein extract powder from shrimp-head waste**. *Food Sci Technol Int*, **2005**, 11(1):49-54

Monfort-Windels F: **La chitine, matériau de demain**. CRIF-WTMC; **2004**: 2

Morris GA, Castile J, Smith A, Adams GG, Harding SE: **Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach**. *Carbohydr Polym*, **2009**, 76(4):616-621

Mosquera MEG, Jamond M, Martinezalonso A, Tascon JMD: **Thermal transformations of kevlar aramid fibers during pyrolysis - Infrared and thermal analysis studies**. *Chemistry of Materials*, **1994**, 6(11):1918-1924

Mourya VK, Inamdar NN, Choudhari YM: **Chitooligosaccharides: Synthesis, Characterization and Applications**. *Polym Sci Ser A*, **2011**, 53(7):583-612

Movagarnejad K, Sohrabi M, Kaghazchi T, Vahabzadeh F: **A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems**. *Biochem Eng J*, **2000**, 4(3):197-206

Mura G, Venanzi P, Avalle V, Quaglia GB: **Fatty acid and amino acid composition of two fairy shrimp species (Crustacea, Anostraca) from Italy: Chirocephalus diaphanus and Chirocephalus kerkyrrensis**. *Hydrobiologia*, **1994**, 286(3):149-154

Muzzarelli RA: **Chitin; Chitosan**: Pergamon Press; **1977**

- Nadarajah K, Kader J, Mazmira M, Paul DC: **Production of Chitosan by Fungi**. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2001**, 4(3):261-265
- Muzzarelli C, Muzzarelli RAA: **Chitin related food science today (and two centuries ago)**. *Agro Food Ind Hi-Tech*, **2003**, 14(5):39-42
- Muzzarelli RAA: **Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers**. *Mar Drugs*, **2010**, 8(2):292-312
- Naguib YMA: **Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids**. *J Agric Food Chem*, **2000**, 48(4):1150-1154
- Nakano Y, Bin Y, Bando M, Nakashima T, Okuno T, Kurosu H, Matsuo M: **Structure and mechanical properties of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films**. *Macromolecular symposia*, **2007**, 258:63-81
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H: **Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (Katsuwonus pelamis)**. *Eur Food Res Technol*, **2010**, 231(2):259-269
- Nam K-S, Kim M-K, Shon Y-H: **Chemopreventive effect of chitosan oligosaccharide against colon carcinogenesis**. *Journal of microbiology and biotechnology*, **2007**, 17(9):1546-1549
- Narayan B, Velappan SP, Zituji SP, Manjabhatta SN, Gowda LR: **Yield and chemical composition of fractions from fermented shrimp biowaste**. *Waste Management & Research*, **2010**, 28(1):64-70
- Nawani NN, Prakash D, Kapadnis BP: **Extraction, purification and characterization of an antioxidant from marine waste using protease and chitinase cocktail**. *World J Microbiol Biotechnol*, **2010**, 26(8):1509-1517
- Nemtsev SV, Zueva OY, Khismatullin MR, Albulov AI, Varlamov VP: **Isolation of chitin and chitosan from honeybees**. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, **40**(1):39-43
- Neville AC, Parry DA, Woodhead-Galloway J: **The chitin crystallite in arthropod cuticle**. *J Cell Sci*, **1976**, 21(1):73-82
- Ng C-H, Hein S, Chandkrachang S, Stevens WF: **Evaluation of an improved acid hydrolysis-HPLC assay for the acetyl content in chitin and chitosan**. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2006**, 76B(1):155-160
- No HK, Meyers SP: **Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams**. *J Agric Food Chem*, **1989**, 37(3):580-583
- No HK, Hur EY: **Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin**. *J Agric Food Chem*, **1998**, 46(9):3844-3846
- No HK, Meyers SP: **Application of chitosan for treatment of wastewaters**. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York: Springer-Verlag; **2000**: 1-27
- No HK, Lee SH, Park NY, Meyers SP: **Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process**. *J Agric Food Chem*, **2003**, 51(26):7659-7663
- Ogawa M, Maia EL, Fernandes AC, Nunes ML, de Oliveira MEB, Freitas ST: **Waste from the processing of farmed shrimp: a source of carotenoid pigments**. *Ciencia Tecnol Aliment*, **2007**,

27(2):333-337

Okuyama K, Noguchi K, Miyazawa T, Yui T, Ogawa K: **Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan**. *Macromolecules*, **1997**, 30(19):5849-5855

Osorio-Madrado A, David L, Trombotto S, Lucas JM, Peniche-Covas C, Domard A: **Kinetics Study of the Solid-State Acid Hydrolysis of Chitosan: Evolution of the Crystallinity and Macromolecular Structure**. *Biomacromolecules*, **2010**, 11(5):1376-1386

Pacheco N, Garnica-Gonzalez M, Ramirez-Hernandez JY, Flores-Albino B, Gimeno M, Barzana E, Shirai K: **Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria**. *Bioresour Technol*, **2009**, 100(11):2849-2854

Pacheco N: **Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: Caracterización y aplicación**. Lyon - Iztapalapa: Université de Lyon 1 - Universidad Autonomia Metropolitana de Unidad Iztapalapa; **2010**

Paduraru GD, Aelenei N, Luca D, Cimpoesu N: **New brushite cements analysis**. *Optoelectron Adv Mater-Rapid Commun*, **2011**, 5(3-4):465-468

Pawlak A, Mucha M: **Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends**. *Thermochemica Acta*, **2003**, 396(1-2):153-166

Pan XD, Chen FQ, Wu TX, Tang HG, Zhao ZY: **Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel**. *J Zhejiang Univ-SCI B*, **2009**, 10(4):258-263

Park PJ, Je JY, Kim SK: **Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer**. *Carbohydr Polym*, **2004**, 55(1):17-22

Park KM, Joung YK, Park KD, Lee SY, Lee MC: **RGD-conjugated chitosan-Pluronic hydrogels as a cell supported scaffold for articular cartilage regeneration**. *Macromol Res* **2008**, 16(6):517-523

Paulino AT, Simionato JJ, Garcia JC, Nozaki J: **Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides**. *Carbohydr Polym*, **2006**, 64(1):98-103

Pearson FG: **Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin**. *Polymer Chemistry*, **1960**, 43(141):101-116

Peña J, Izquierdo-Barba I, Martinez A, Vallet-Regi M: **New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature**. *Solid State Sci*, **2006**, 8(5):513-519

Peterson GL: **Review of the Foline Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall**. *Analytical Biochemistry*, **1979**, 100(2):201-220

Pillai CKS, Paul W, Sharma CP: **Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation**. *Prog Polym Sci*, **2009**, 34(7):641-678

Percot A, Viton C, Domard A: **Characterization of shrimp shell deproteinization**. *Biomacromolecules*, **2003 (a)**, 4(5):1380-1385

Percot A, Viton C, Domard A: **Optimization of chitin extraction from shrimp shells**. *Biomacromolecules* **2003 (b)**, 4(1):12-18

Perez-Galvez AR: **Le compactage: Une solution pour un meilleur management des bioressources**

marines. Applications aux rejets et co-produits de poisson. Nantes: Université de Nantes; **2009**

Peniche C, Argüelles-Monal W, Peniche H, Acosta N: **Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation.** *Macromolecular Bioscience*, **2003**, 3(10):511-520

Phuvasate S, Su YC: **Comparison of Lactic Acid Bacteria Fermentation with Acid Treatments for Chitosan Production from Shrimp Waste.** *J Aquat Food Prod Technol*, **2010**, 19(3):170-179

Plassard C, Mousain D, Salsac L: **Dosage of chitin on ectomycorrhizae of the maritime pine (Pinus Pinaster) associated with Pisolithus tinctorius. Evaluation of mycelle mass and mycorrhization.** *Can J Bot-Rev Can Bot*, **1983**, 61(3):692-699

Pochanavanich P, Suntornsuk W: **Fungal chitosan production and its characterization.** *Lett Appl Microbiol*, **2002**, 35(1):17-21

Poirier M: **Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-Diméthylacétamide Chlorure de lithium.** Université de Laval; **2000.**

Poirier M, Charlet G: **Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system.** *Carbohydr Polym*, **2002**, 50(4):363-370

Prashanth KVH, Tharanathan RN: **Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis.** *Biochimica et biophysica acta-general subjects*, **2005**, 1722(1):22-29

Raabe D, Sachs C, Romano P: **The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material.** *Acta Mater*, **2005**, 53(15):4281-4292

Raabe D, Romano P, Sachs C, Fabritius H, Al-Sawalmih A, Yi S, Servos G, Hartwig HG: **Microstructure and crystallographic texture of the chitin-protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster Homarus americanus.** *Mater Sci Eng A-Struct Mater Prop Microstruct Process*, **2006**, 421(1-2):143-153

Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W: **Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action.** *Biomacromolecules*, **2003**, 4(6):1457-1465

Randriamahatody Z: **Valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes: Utilisation des la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles a Madagascar.** Université d'Antananarivo; **2011**, p236

Rao SVS, Yashodha KP, Mahendrakar NS, Puttarajappa P: **Deacetylation of chitin at low temperature by a novel alkali impregnation technique.** *Indian Journal of Technology*, **1987**, 25(4):194-196

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV: **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** *Microbiol Mol Biol Rev*, **1998**, 62(3):597-635

Rao MS, Nyein KA, Trung TS, Stevens WF: **Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (S. empusa).** *J Appl Polym Sci*, **2007**, 103(6):3694-3700

Rassam M, Laing WA: **The interaction of the 11S globulin-like protein of kiwifruit seeds with pepsin.** *Plant Sci*, **2006**, 171(6):663-669

Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Tabata Y, Damrongsakkul S: **Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films.** *Carbohydr Polym*, **2009**, 78(4):873-878

- Ravindra R, Krovvidi KR, Khan AA: **Solubility parameter of chitin and chitosan.** *Carbohydr Polym*, **1998**, 36(2-3):121-12
- Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, Locksley RM: **Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy.** *Nature*, **2007**, 447(7140):92-U97-92-U97
- Reginald F A: **Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography.** *Journal of Chromatography A*, **1974**, 95(2):189-212
- Rehbein H: **Amino acid composition and pepsin digestibility of krill meal.** *J Agric Food Chem*, **1981**, 29(3):682-684
- Revol JF, Marchessault RH: **In vitro chiral nematic ordering of chitin crystallites.** *Int J Biol Macromol*, **1993**, 15(6):329-335
- Rhazi M, Desbrieres J, Tolaimate A, Alagui A, Vottero P: **Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan.** *Polymer International*, **2000**, 49(4):337-344
- Rhee JS, Jung MW, Paeng KJ: **Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water.** *Anal Sci*, **1998**, 14(6):1089-1092
- Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P *et al*: **Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing.** *Wound Repair Regen*, **2009**, 17(6):817-824
- Rigby GW: **Substantially undegraded deacetylated chitin and process for producing the same.** *United States Patent Office.* du Pont de Nemours & Company, Wilmington, a corporation of Delaware. United States: 2040879; **1934**: 7
- Rigby GW: **Chemical Process and Chemical Compounds derived therefrom.** *United States Patent Office.* du Pont de Nemours & Company, Wilmington, a corporation of Delaware. United States: 2047226; **1935**: 4
- Rinaudo M: **Chitin and chitosan: Properties and applications.** *Progress in Polymer Science* **2006**, 31(7):603-632
- Rinaudo M: **Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials.** *Polym Int*, **2008**, 57(3):397-430
- Roberts GAF: **Chitin chemistry.** London: Macmillan; **1992**
- Roer R, Dillaman R: **The Structure and Calcification of the Crustacean Cuticle.** *American Zoologist*, **1984**, 24 (4):893-909
- Romano P, Fabritius H, Raabe D: **The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material.** *Acta Biomaterialia*, **2007**, 3(3):301-309
- Ramos-Ponce LM, Vega M, Sandoval-Fabian GC, Colunga-Urbina E, Balagurusamy N, Rodriguez-Gonzalez FJ, Contreras-Esquivel JC: **A Simple Colorimetric Determination of the Free Amino Groups in Water Soluble Chitin Derivatives Using Genipin.** *Food Sci Biotechnol*, **2010**, 19(3):683-689

Rouessac F, Rouessac A, Cruché D, Ourisson G: **Analyse Chimique - Méthodes et techniques instrumentales modernes**, 2004, Dunod, Sciences Sup

Sachindra NM, Mahendrakar NS: **Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils**. *Bioresour Technol*, 2005, 96(10):1195-1200

Sachindra NM, Bhaskar N, Siddegowda GS, Sathisha AD, Suresh PV: **Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste**. *Bioresour Technol*, 2007, 98(8):1642-1646

Sachindra NM, Bhaskar N: **In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste**. *Bioresour Technol*, 2008, 99(18):9013-9016

Sachindra NM, Mahendrakar NS: **Effect of Protease Treatment on Oil Extractability of Carotenoids from Shrimp Waste**. *J Aquat Food Prod Technol*, 2011, 20(1):22-31

Scheruhn E, Wille P, Knorr D: **Studies of acid binding properties of chitosan in coffee beverages**. *Nahr-Food*, 1999, 43(2):100-104

Schimmelmann A: **Carbon, Nitrogen and Oxygen Stable Isotope Ratios in Chitin**. In: *Chitin*. Edited by Gupta NS, vol. 34. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011: 81-10

Senel S, McClure SJ: **Potential applications of chitosan in veterinary medicine**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(10):1467-1480

Seoudi R, Nada AMA: **Molecular structure and dielectric properties studies of chitin and its treated by acid, base and hypochlorite**. *Carbohydr Polym*, 2007, 68(4):728-733

Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ: **Food applications of chitin and chitosans**. *Trends Food Sci Technol*, 1999, 10(2):37-51

Shahidi F: **Nutraceuticals and bioactives from seafood byproducts**. In: *Advances in seafood byproducts, 2002 Conference proceedings*. Edited by Bechtel PJ. University of Alaska, Fairbanks: Alaska Sea Grant Program; 2002: 247-263

Shahidi F, Abuzaytoun R: **Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects**. In. Edited by Steve LT, vol. Volume 49: Academic Press; 2005: 93-135

Shen Z, Jacobs-Lorena M: **Evolution of Chitin-Binding Proteins in Invertebrates**. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, 48(3):341-347

Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ: **Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis**. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8):1864-1871

Shimojoh M, Fukushima K, Kurita K: **Low-molecular-weight chitosans derived from beta-chitin: preparation, molecular characteristics and aggregation activity**. *Carbohydr Polym*, 1998, 35(3-4):223-231

Sigma-Aldrich, **Biomaterials – Tutorial**, 2012, [<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/biomaterials/tutorial.html>]

Sini TK, Santhosh S, Mathew PT: **Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using Bacillus subtilis fermentation**. *Carbohydr Res*, 2007, 342(16):2423-2429

Skorik YA, Pestov AV, Yatluk YG: **Evaluation of various chitin-glucan derivatives from**

- Aspergillus niger as transition metal adsorbents.** *Bioresour Technol*, **2010**, 101(6):1769-1775
- Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, Suginta W: **Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism.** *J Struct Biol*, **2008**, 162(3):491-49
- Sorlier P, Denuziere A, Viton C, Domard A: **Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan.** *Biomacromolecules*, **2001**, 2(3):765-772
- Sorlier P, Rochas C, Morfin I, Viton C, Domard A: **Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degrees of acetylation.** *Biomacromolecules*, **2003**, 4(4):1034-1040
- Stankiewicz BA, vanBergen PF, Duncan IJ, Carter JF, Briggs DEG, Evershed RP: **Recognition of chitin and proteins in invertebrate cuticles using analytical pyrolysis gas chromatography and pyrolysis gas chromatography mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1996**, 10(14):1747-1757
- Suetake T, Aizawa T, Koganesawa N, Osaki T, Kobashigawa Y, Demura M, Kawabata S-i, Kawano K, Tsuda S, Nitta K: **Production and characterization of recombinant tachycitin, the Cys-rich chitin-binding protein.** *Protein Engineering*, **2002**, 15(9):763-769
- Sun LP, Du YM, Yang JH, Shi XW, Li J, Wang XH, Kennedy JF: **Conversion of crystal structure of the chitin to facilitate preparation of a 6-carboxychitin with moisture absorption-retention abilities.** *Carbohydr Polym*, **2006**, 66(2):168-175
- Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M: **Antitumor effect of hexa-N-Acetylchitohexaose and chitohexaose.** *Carbohydr Res*, **1986**, 151:403-408
- Swift M: **The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi.** *Soil Biological & Biochemistry*, **1973**, 5(3):321-332
- Synowiecki J, Al-Khateeb N: **The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards.** *Food Chem*, **2000**, 68(2):147-152
- Synowiecki J, Al-Khateeb NA: **Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2003**, 43(2):145-171
- Taboada E, Cabrera G, Cardenas G: **Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions.** *J Chil Chem Soc*, **2003**, 48(1):7-12
- Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T: **Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target.** *Parasitol Int*, **2009**, 58(3):243-248
- Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H, Ochi K: **Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168.** *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, 46(2):315-320
- Tang WJ, Wang CX, Chen DH: **Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan.** *Polym Degrad Stabil*, **2005**, 87(3):389-394
- Teng WL, Khor E, Tan TK, Lim LY, Tan SC: **Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi.** *Carbohydr Res*, **2001**, 332(3):305-316

- Terbojevich M, Cosani A, Muzzarelli RAA: **Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain.** *Carbohydr Polym*, **1996**, 29(1):63-68
- Thanou M, Junginger HE: **Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives.** New York: Dumitriu S; **2005**
- Tokura S, Tamura H: **Chitin and Chitosan.** In: *Comprehensive Glycoscience.* Edited by Johannis PK. Oxford: Elsevier; **2007**: 449-475
- Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A, Vincendon M, Vottero P: **On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin.** *Polymer*, **2000**, 41(7):2463-2469
- Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A: **Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties.** *Polymer*, **2003**, 44(26):7939-7952
- Tormo J, Lamed R, Chirino AJ, Morag E, Bayer EA, Shoham Y, Steitz TA: **Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: A general mechanism for attachment to cellulose.** *Embo J*, **1996**, 15(21):5739-5751
- Tsai YL, Hayward RE, Langer RC, Fidock DA, Vinetz JM: **Disruption of Plasmodium falciparum chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut.** *Infect Immun*, **2001**, 69(6):4048-4054
- Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL: **Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation.** *Fish Sci*, **2002**, 68(1):170-177
- Tsai GJ, Zhang SL, Shieh PL: **Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan.** *Journal of Food Protection*, **2004**, 67(2):396-398
- Tsai ML, Tseng LZ, Chang HW, Hsu CH, Chen RH: **Facile method to manipulate the molecular weight and practical mass production of chitosan by mechanical shearing and concurrent ultrafiltration treatment.** *J Appl Polym Sci*, **2010**, 118(3):1442-1449
- Tsigos I, Bouriotis V: **Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from Colletotrium-Lindemuthianum.** *J Biol Chem*, **1995**, 270(44):26286-2629
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V: **Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology.** *Trends Biotechnol*, **2000**, 18(7):305-312
- Turk B: **Targeting proteases: successes, failures and future prospects.** *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5(9):785-799
- Valente LMP, Cornet J, Donnay-Moreno C, Gouygou JP, Berge JP, Bacelar M, Escorcio C, Rocha E, Malhao F, Cardinal M: **Quality differences of gilthead sea bream from distinct production systems in Southern Europe: Intensive, integrated, semi-intensive or extensive systems.** *Food Control*, **2011**, 22(5):708-717
- Valdez-Peña AU, Espinoza-Perez JD, Sandoval-Fabian GC, Balagurusamy N, Hernandez-Rivera A, De-la-Garza-Rodriguez I, Contreras-Esquivel JC: **Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery.** *Food Sci Biotechnol*, **2010**, 19(2):553-557
- Valjamae P, Kipper K, Pettersson G, Johansson G: **Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics.** *Biotechnol Bioeng*, **2003**, 84(2):254-257

Vårum KM, Kristiansen Holme H, Izume M, Torger Stokke B, Smidsrød O: **Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1996**, 1291(1):5-15

Vauchel P: **Optimisation de procédés innovant pour l'obtention de Phycocolloïdes**, 2007, Université de Nantes

Vikhoreva GA, Gorbacheva IN, Galbraikh LS: **Synthesis and properties of water-soluble derivatives of chitin. A review.** *Fibre Chemistry*, **1999**, 31(4):274-278

Vincendon M: **Regenerated chitin from phosphoric acid solutions.** *Carbohydr Polym*, **1997**, 32(3-4):233-237

Vincent JFV: **Arthropod cuticle: a natural composite shell system.** *Compos Pt A-Appl Sci Manuf*, **2002**, 33(10):1311-1315

Wang SL, Chio SH: **Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187.** *Enzyme Microb Technol*, **1998**, 22(7):629-633

Wang S-L, Yang C-W, Liang T-W, Peng J-H, Wang C-L: **Degradation of chitin and production of bioactive materials by bioconversion of squid pens.** *Carbohydr Polym*, **2009**, 78(2):205-212

Wang S-L, Liang T-W, Yen Y-H: **Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials.** *Carbohydr Polym*, **2011**, 84(2):732-742

Weinhold MX, Sauvageau JCM, Kumirska J, Thoming J: **Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations.** *Carbohydr Polym*, **2009**, 78(4):678-684

Willis JH: **Structural cuticular proteins from arthropods: Annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **2010**, 40(3):189-204

Wu T, Zivanovic S, Draughon FA, Sams CE: **Chitin and Chitosan Value-Added Products from Mushroom Waste.** *J Agric Food Chem*, **2004**, 52(26):7905-7910

Wu T, Zivanovic S: **Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method.** *Carbohydr Polym*, **2008**, 73(2):248-253

Wu T, Zivanovic S, Hayes DG, Weiss J: **Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters.** *J Agric Food Chem*, **2008**, 56(13):5112-5119

Xu Y, Gallert C, Winter J: **Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification.** *Appl Microbiol Biotechnol*, **2008**, 79(4):687-697

Yaghobi N, Mirzadeh H: **Enhancement of chitin's degree of deacetylation of multistage alkali treatments.** *Iran Polym J*, **2004**, 13(2):131-136

Yang BY, Montgomery R: **Degree of acetylation of heteropolysaccharides.** *Carbohydr Res*, **2000**, 323(1-4):156-162

Yang JK, Shih IL, Tzeng YM, Wang SL: **Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes.** *Enzyme Microb Technol*, **2000**, 26(5-6):406-413

Yap J, Isa MH, Kutty SRM: **Removal of colour from textile wastewater using oil palm ash.** 2008

Yen M, Mau J: **Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipes.** *LWT - Food Science and Technology*, **2007**, 40(3):558-563

Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T: **Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan.** *Arzneimittelforschung*, **2002**, 52(1):1-7

Zakaria Z, Hall GM, Shama G: **Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery.** *Process Biochem*, **1998**, 33(1):1-6

Zhang H, Du YG, Yu XJ, Mitsutomi M, Aiba S: **Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme.** *Carbohydr Res*, **1999**, 320(3-4):257-260

Zhang M, Haga A, Sekiguchi H, Hirano S: **Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia.** *Int J Biol*, **2000**, 27(1):99-105

Zhang HQ, Darvell BW: **Formation of Hydroxyapatite Whiskers by Hydrothermal Homogeneous Precipitation Using Acetamide.** *J Am Ceram Soc*, **2011**, 94(7):2007-2013

Zheng H, Tan ZA, Zhan YR, Huang J: **Morphology and properties of soy protein plastics modified with chitin.** *J Appl Polym Sci*, **2003**, 90(13):3676-3682

Zhou F, Wu ZW, Wang ML, Chen KM: **Structure and mechanical properties of pincers of lobster (*Procambarus clarkii*) and crab (*Eriocheir Sinensis*).** *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2010**, 3(6):454-463

Annexes

A. Extrait du journal officiel européen concernant la chitine et le chitosan

5.4.2006

FR

Journal officiel de l'Union européenne

L 97/1

II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 9 février 2006

modifiant la décision 96/335/CE portant établissement d'un inventaire et d'une nomenclature commune des ingrédients employés dans les produits cosmétiques

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(2006/257/CE)

Dénomination INCI	Numéro CAS – Nom chimique	Fonctions
CHITIN	1398-61-4 215-744-3	Agent de foisonnement
CHITIN GLYCOLATE	Chitine, hydroxyacétate	Entretien de la peau
CHITOSAN	9012-76-4 Chitine, désacétylée 135322-32-6	Agent filmogène
CHITOSAN ASCORBATE	chitosane + acide L-ascorbique	Antioxydant/agent filmogène/ entretien de la peau
CHITOSAN FORMATE	66267-52-5, Formiate de chitosane (sel)	Agent filmogène
CHITOSAN GLYCOLATE	Hydroxyacétate de chitosane	Antioxydant/ agent filmogène/ entretien de la peau
CHITOSAN LACTATE	66267-50-6, Chitosane, sel d'hydroxy- 2-propanoate	Agent filmogène
CHITOSAN PCA	117522-93-7 Chitosane, sel de l'acide pyrrolidonecarboxylique	Humectant
CHITOSAN SALICYLATE	84563-67-7 Chitosane, sel de l'hydroxy-2-benzoate	Antioxydant/agent filmogène/ entretien de la peau
CHITOSAN SUCCINAMIDE	N-(3-carboxypropanoyl)+ chitosane	Agent filmogène
SODIUM CARBOXYMETHYL CHITIN		Agent de foisonnement Humectant/conditionneur capillaire/ agent filmogène

B. Recommandations en termes de caractéristiques physico-chimiques pour différentes applications des dérivés de la chitine

Application	General Recommendations	
Wound healing	High DD chitosan preferred over chitin Low Mw samples (oligomers)	
Drug delivery systems	High DD High Mw	
Gene Delivery	DD \leq 80 Low Mw (around 10 kDa)	
Scaffolds (tissue engineering)	DD around 85 (good proliferation and structure) High Mw (prolonged biodegradation)	
Cell immobilization	Chitosan preferred over chitin (high DD)	
Enzyme immobilization	Depend on the enzyme, immobilization method and reaction media Low ash content β -chitin preferred over α -chitin in organic reaction media	
	Adsorption	Chitin for neutral or positively charged proteins Chitosan for negatively charged proteins. High DD
	Covalent	Chitosan for multipoint immobilization. High DD Chitin or chitosan with low DD for single point immobilization
	Encapsulation	Chitosan-TPP High Mw, high DD better retention Chitosan-Alginate PECs Medium Mw better stability
Dietary ingredient	High DD; high Mw (viscosity) Fine particle	
Food preservative	High DD Medium-low Mw (5-80 kDa)	
Emulsifying agent	Low DD for emulsion stability High viscosity	
Waste water treatment	Depend on pollutant and water conditions (pH, ionic strength) In general, chitosan preferred over chitin. High DD Low crystallinity	
Molecular imprinting	Not yet tested High DD is expected to improve crosslinking In general, low Mw chitosan is used	
Metal reduction	Metal reduction depends on chitosan characteristics (not yet fully tested) High DD and low Mw seems to stabilize the nanoparticles	
	Clear relationship between morphology and Mw	Low Mw chitosan 2D chains Medium Mw chitosan: single nanoparticles High Mw chitosan: nanoplates

Aranaz et al. 2009

C. Exemples de fiches techniques de produits commerciaux dérivés de chitine

	Produit 1 www.dalwoo.tripod.com			Produit 2 www.tootoo.com (ALIBABA)		
	Technical	Pharmaceutical	Food industry	Technical	Pharmaceutical	Food industry
Appearance	White or Yellow Powder	White or Yellow Powder or flake	White or Yellow, Powder or flake	Translucent/pale - flake/powder	White translucent flakes/powder	White translucent flakes/powder
Density	Pass 25 - 200 Mesh	Pass 25 - 200 Mesh	Pass 25 - 200 Mesh			
Moisture Content	≤10%	≤ 10%	≤ 10%	≤ 12%	≤ 8%	≤ 8%
Protein Content	≤ 0,3%	≤ 0,2%	≤ 0,2%			
Ash Content	≤ 0,5%	≤ 0,3%	≤ 0,3%	≤ 2%	≤ 1%	≤ 1%
DA	70 - 100%	70 - 100%	70 - 100%	80 à 95%	95 à 99%	85 à 95%
Viscosity	50-500cps	5 cps and less	5 cps and less	5 à 50 mpa.s :low 50-300 :middle >800 mpa.s :high	50 à 800 mpa.s	5 à 300 mpa.s
Insolubles	≤ 1%	≤ 1%	≤ 1%	≤ 2%	≤ 0,32%	≤ 0,72%
Heavy metals(As)	≤ 10 ppm	≤ 10 ppm	≤ 10 ppm	< 0,0005%	< 0,0005%	
Heavy metals(Pb)	≤ 10 ppm	≤ 10 ppm	≤ 10 ppm			
pH	7 - 9	7 - 9	7 - 9	7-8	7-8	7-8
Odor	No taste and smell	No taste and smell	No taste and smell			
Total bacterial				<3000 ufc/g	<1000 ufc/g	<1000 ufc/g
Salmonelle						none
E.coli						40

Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisation des produits et optimisation du procédé

L'objectif de l'étude porte sur l'optimisation de l'extraction de la chitine par protéolyse acide. L'originalité du procédé repose sur la stabilisation du pH grâce à l'équilibre entre la composition du substrat et le solvant acide. Ce principe permet de réaliser simultanément la déminéralisation et la déprotéinisation, les deux principales réactions associées à la purification de la chitine. Pour évaluer les performances de cette purification, la composition du substrat et des produits est caractérisée. Différentes méthodes de quantification de la chitine et des protéines sont comparées. Contrairement aux dosages traditionnels, une méthode directe de dosage des acides aminés est sélectionnée pour estimer la quantité de protéines. L'estimation de la quantité de chitine repose sur des méthodes indirectes, principalement la gravimétrie, l'analyse élémentaire et l'analyse thermogravimétrique (ATG). Les cinétiques de déminéralisation et de déprotéinisation sont étudiées en vue d'optimiser la purification de la chitine. Les bilans massiques confirment la cohérence des résultats. Les caractéristiques physico-chimiques de la chitine obtenue par voie enzymatique, le degré d'acétylation, le degré de dépolymérisation et l'indice de cristallinité, sont comparées à la chitine obtenue par voie chimique. La structure de la chitine a également été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). Enfin, les composés solubilisés par l'hydrolyse enzymatique sont identifiés et quantifiés.

Mots-clés : coproduits de crustacés, hydrolyse enzymatique, protéolyse, chitine, extraction, cinétique, déminéralisation, déprotéinisation.

Purification of chitin by enzymatic hydrolysis from shrimp *Penaeus vannamei* by-products. Products characterization and process optimization

The objective of this study was to optimize the extraction of chitin by acid proteolysis. The novelty of the method is based on the stabilization of pH by the balance between substrate composition and the acid solvent. This principle allows a simultaneous demineralization and deproteinization, the two main reactions associated with the purification of chitin. To evaluate the performance of this purification, the composition of the substrate and products was characterized. Different methods of quantification of chitin and proteins have been compared. As traditional assays were not satisfying, a direct method of amino acids determination by gaz chromatography was selected to estimate the amount of protein. The estimate of chitin amount was based on indirect methods, mainly gravimetry, elemental analysis and thermogravimetric analysis (TGA). Kinetics of demineralization and deproteinization were examined to optimize the purification of chitin. Mass balances confirmed the consistency of results. The quality of chitin extracted by enzymatic or chemical techniques was compared with the degree of acetylation and depolymerization and the crystallinity index of chitin. The structure of chitin was also observed by scanning electron microscopy (SEM). Finally, compounds solubilized by enzymatic hydrolysis were identified and quantified.

Key-words: crustacean by-products, enzymatic hydrolysis, proteolysis, chitin, extraction, kinetic, demineralization, deproteinization.